

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

ACCIONES PROINFLAMATORIAS
DE LOS PÉPTIDOS DE ANGIOTENSINA.
IMPLICACIÓN EN EL DAÑO RENAL
Y VASCULAR

Directores: Dra. Marta Ruiz-Ortega
Dr. Jesús Egido de los Ríos

R.F.M. 20833

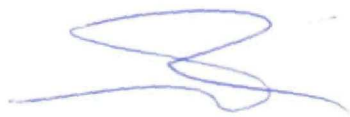
TESIS DOCTORAL

OSCAR LORENZO GONZÁLEZ


Madrid 2001



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de favorable CUALA VOED
Madrid, 3 de Julio 1901

A stylized, cursive signature in blue ink, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke.A cursive signature in blue ink, featuring a prominent 'd' and 'h'.A cursive signature in blue ink, appearing to start with a 'V' or 'U'.

Secretario

A cursive signature in blue ink, with the word 'Secretario' written above it.

A mis padres...

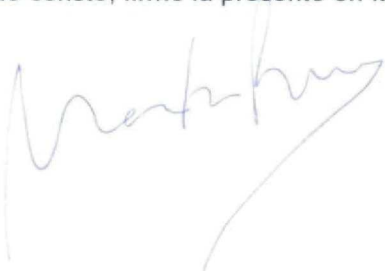
Esta Tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Nefrología y
Patología Vascular de la Fundación Jiménez Díaz
bajo la dirección de la Dra. Marta Ruiz-Ortega, investigadora del
Sistema Nacional de Salud, y por el Dr. Jesús Egido de los Ríos,
Catedrático de Medicina de la U.A.M.

Doña Marta Ruiz-Ortega, Investigadora del Sistema Nacional de Salud, y Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina y Profesor Titular de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Don Oscar Lorenzo González, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección las experiencias necesarias para la realización de la presente Tesis Doctoral

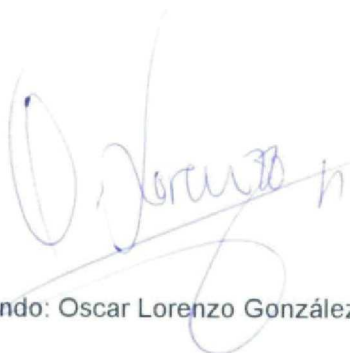
Y para que conste, firmo la presente en Madrid a 10 de Mayo de 2001.



Fdo. Director: Dra. Marta Ruiz-Ortega



Director: Dr. Jesús Egido de los Ríos



Fdo. Doctorando: Oscar Lorenzo González

Agradecimientos:

En primer lugar quisiera agradecer a Jesús Egido por haberme dado la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación biomédica y poder descubrir y participar en multitud de proyectos de indudable valor científico.

A mi otra directora de Tesis por guiarme, aconsejarme y permitirme aprender de ella todo lo que sé. Marta, es una gran satisfacción compartir contigo todos los momentos; los buenos, que ha habido bastantes y algunas veces los "no tan", pero siempre en equipo y contando con tu amistad. Y no te preocupes...siempre le sacaré a bailar.

Continuo con el resto de "angiotensinos". A nuestras dos niñas, Rupí y Van, aquellas compañeras esenciales para el trabajo del grupo. Gracias a las dos, y...Rupí, ya sabes quien es el siguiente de la cuadrilla en doctorarse no?, y tu Van, pues eso, que...tiki-taka.

Agradecer igualmente al resto del personal del laboratorio, comenzando por los técnicos Belén y Vanexa,...que hubiera sido del trabajo de todos sin contar con el vuestro. Continuo con las cuatro "niñas"; Purita, Nata, Corina y Chus. No cambiéis nunca chicas,...bueno tu sí. No quisiera olvidar, por la cuenta que me tiene, a Pi y a Almu, que aunque parece que pasáis desapercibidas, no lo hacéis.

Quisiera agradecer también a las dos madrazas del laboratorio, Carmen y Mónica, por su inestimable labor y consejos que siempre ayudan, y por mostrarme otra manera diferente de vivir. Dieguín siempre tendrá la edad de esta Tesis, y tu, super-IP, pues eso que espero que "te aproveche,...chica".

A "Luis pollufo" y "Vamos Hose" por apoyarme...en alguna que otra barra de no recuerdo qué lugar. Ahora os toca apretar a vosotros que sois los siguientes. A los lechones Oskichu y Guilli por su lento pero seguro trabajo, y por compartir esos últimos momentos del día. Y a Julio y Alberto,...que deciros!!, que mirad donde he llegado. Quién lo iba a decir en el María, no?, y tu Alberto, de verdad, no cambies nunca. Siempre es bueno conservar en estos lugares a alguien como tu. Además quería mencionar especialmente a Yusuke por su constante trabajo y amabilidad, y por saber encajar en un país tan diferente y peculiar como este. Eres el japonés más simpático que conozco...

ありがとう

A los que eligieron otro camino,...probablemente mejor, pero que siempre recordamos, Miguel Ángel y Carmen B., y también Silvi Mama, Javi Papa y Catoto,...que aunque no se muy bien quienes son, he oído hablar de ellos. Al resto de gente del laboratorio, que al igual que todos también ayudan o ayudaron a que este barco permanezca a flote. A M^a Jo, Raquel (con su oscarlorenzo), Olga, Irene, Marina, Nuria, Maritina e Itziar. A las nuevas, M^a Ángeles, Marisa, Marta e Ilse, al equipo de Jesús G, Rosario y May, y a las chicas del animalario.

Además me gustaría mencionar en esta Tesis a aquellas personas de otros departamentos que también aportaron su granito. A la paciencia de Lilo, a Iñaki y Charly, por poder contar siempre con ellos y amenizarnos con sus emilios. A Juanan, José, Isabel y Sandri porque aunque somos "los de enfrente", no permitieron nunca que estuviéramos enfrentados. A Yas, Richar, Ana y al equipo FJD, porque también fuera de aquí hay que disfrutar. Y no quisiera pasar por alto a todos los que nos ayudaron tras el incendio, como el laboratorio de Neumo, M. Óseo, Inmuno, Genética, Pato, y Respiratorio, y en especial al Subdirector de Investigación por su "inestimable ayuda" en los momentos difíciles...

Agradecer a José Luis T., J.M. Monzón y M13, por dejarme plagiar y amenizar tantos momentos a su costa. Y a Pedja por haber despertado al Madrid de su letargo. Además quisiera rememorar a David y Chicone, aquellos incondicionales que me siguen desde hace tiempo (13?). Nada de esto hubiera sido posible sin aquel "holding". Aquellas divinas veladas nos bash-taron para seguir a tope sin caer en ese oscuro espacio donde otros se perdían,...se cumplió la profecía al calor de la luna y a veces del sol. A Angel, Kike, Luis y en especial a Raúl por habernos dedicado parte de vuestra juventud...debía ser imposible con todos no?. Y a esas chicas que tanto quise, o no, y en especial a alguna, que si algún día está "preparada" para leer esto, sabrá de quien hablo. A Marti, a ti Belén, para que sigas rompiendo esa teoría, y a Tami por intentar comprenderlo (...ya se recuperará).

Finalmente y de modo especial a mi familia a la que tanto añoro en mi etapa emancipada. A mis hermanos a los que debo mi personalidad y mi manera de hacer, y a mis padres por creer en mi, ayudarme y quererme (...a veces demasiado), y por haberle concedido a la investigación de este país un miembro más. A mi abuelo que me alentó con su "constancia y perseverancia", y a mi Marcelo, porque seguro que me está observando ahora desde algún lugar (...mira para lo que sirvieron las ratas!).

...y que me perdone todo aquel que se me quede en el tintero, pues son muchos a los que debo agradecer esta Tesis...

*It is nice to be important,
but it is more important
to be nice.....*

- Este trabajo ha sido publicado parcialmente en:

-M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo¹, M. Rupérez, J. Blanco and J. Egidio. "Angiotensin II activates nuclear factor- κ B via AT₁ and AT₂ receptors in the kidney". *Am. J. Pathol.* 158: 1743-1756, 2001. (1: contribución igual del 1º y 2º firmante).

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, Y. Suzuki, M. Rupérez, J. Egidio. "Proinflammatory actions of Angiotensin II". *Current Opin Nephrol Hypertens* 10:321-329, 2001.

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, M. Rupérez, Y. Suzuki, J. Egidio. "Angiotensin II activates nuclear transcription factor κ B in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT₁ knockout mice". *Nephrol. Dial. Transplant.* 16 [Suppl 6]: 1-7, 2001.

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, M. Rupérez, König, B. Wittig, J. Egidio. "Role of AT₁ and AT₂ receptors in angiotensin II-induced nuclear transcription factor κ B activation in vascular smooth muscle cells". *Cir. Res.* 23;86(12): 1266-1272, 2000.

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, J. Egidio. "Angiotensin III increases monocytic chemotactic protein-1 and activates nuclear transcription factor κ B and activator protein-1 in cultured mesangial and mononuclear cells". *Kidney Int.* ;57(6):2285-2298, 2000.

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, M. Rupérez and J. Egidio. "ACE inhibitors and AT₁ receptor antagonists beyond the hemodynamic effect". Editorial Comment *Nephrol Dial Transplant.* 15: 561-565, 2000.

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, JJ. Plaza, J. Egidio. "Nuevos aspectos del sistema renina angiotensina en la enfermedad renal progresiva". *Nefrología Latinoamericana* 5:193-201, 1999.

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, J. Egidio. "Angiotensin III upregulates genes involved in kidney damage in cultured mesangial cells and renal interstitial fibroblast". *Kidney Int.* 54:S41-S45, 1998.

- M. Ruiz-Ortega, C. Bustos, MA. Hernández-Presa, O. Lorenzo, J. J Plaza, J. Egidio. "Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in the kidney through nuclear factor-kappaB activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis". *J. Immunol.* 161:430-439, 1998.

- Otros trabajos están en revisión o sometidos a publicación en:

- O. Lorenzo, M. Ruiz-Ortega, Y. Suzuke, M. Rupérez, J. Egidio. "Angiotensin III activates nuclear transcription factor kappa B in cultured mesangial cells preferentially through the AT₂ Receptor. Studies in AT₁ Knockout Mice". *J Am Soc Nephrol* (en revisión).

- M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, M. Rupérez, V. Esteban, S. Mezzano, J. Egidio. "Renin angiotensin system and renal damage. Emerging data on Angiotensin II as a proinflammatory mediator". *Capítulo de libro Contribution Nephrology 2001* (en prensa).

- O. Lorenzo, M. Ruiz-Ortega, Y. Suzuki, M. Rupérez, V. Esteban, J. Blanco, LM Blanco-Colio, C. Lorz, S. Mezzano and J. Egidio. "Role of AT₁ and AT₂ receptors and the NF- κ B pathway in unilateral ureteral obstruction nephropathy. Studies in AT₁ knockout mice". *Hypertension* (en revisión).

- O. Lorenzo, M. Ruiz-Ortega, S. Santos, M. Rupérez, J. Blanco, L. Ortega, P. Esbrit, J. Egido. "Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein and its receptor in the kidney". *J Am Soc Nephrol* (sometido a publicación).
- O. Lorenzo, M. Rupérez, V. Esteban, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. "Angiotensin IV elicits a proinflammatory phenotype in vascular smooth muscle cells". *Circulation Res.* (sometido a publicación).
- M. Rupérez, O. Lorenzo, L. Blanco-Colio, V. Esteban, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. "Angiotensin II increases connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells". *Circulation Res.* (sometido a publicación).

- Partes de este trabajo han sido presentadas en los siguientes congresos:

- European Meeting on Hypertension. Milan (Italia), Junio 2001. Göteborg (Suecia), Mayo 2000. Amsterdam (Holanda) Mayo 1999.
- International Society of Hypertension. Chicago (USA), Agosto 2000.
- International Conference on New Targets of the NF- κ B Pathway for Novel Therapies in Cancer and Inflammation. Madrid, Junio 2000.
- Congress of the American Society of Nephrology. Toronto (Canada), Noviembre 2000. Miami (USA), Noviembre 1999. San Antonio, Noviembre 1997.

- Y otras han recibido los premios:

- Premio a la Comunicación Oral (2º premio) por el trabajo: "La Angiotensina II es un nuevo mediador del daño vascular". Reunión Anual de la Sección de Hipertensión Arterial de la Sociedad Española de Cardiología, Mallorca, Abril 2001.
- Premio BIAL 2000 por el trabajo: "Angiotensin II activates the nuclear factor κ B in vascular and renal cells. Implication for the pathogenesis of hypertension, atherosclerosis and kidney diseases". Portugal, Marzo 2001.
- Premio del Congreso Nacional de Cardiología por la mejor comunicación "Nuevos aspectos de Angiotensina II en el daño vascular. Activación del factor de transcripción NF- κ B vía receptores AT₁ y AT₂". Granada, Septiembre 2000.
- Premios (semifinalista) a dos comunicaciones presentadas al XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Aterosclerosis. Cádiz, Septiembre 1998.
- Premio de Nefrología Básica Hospal 1997. "Los productos de degradación de la Angiotensina II activan el factor de transcripción NF- κ B e incrementan la expresión de genes implicados en el daño renal". Madrid, Octubre 1997.

ÍNDICE

ÍNDICE

<u>Apartado</u>	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
1. Sistema renina-angiotensina.....	3
1.1 Componentes del SRA	4
2. Receptores de angiotensina.....	5
3. Farmacología del SRA.....	7
3.1 Inhibidores de la ECA.....	8
3.2 Antagonistas del receptor AT ₁	9
4. Características del daño renal.....	10
4.1 Células Mesangiales Glomerulares.....	11
4.2 Células Tubulares Epiteliales.....	11
4.3 Células Monocíticas y quimioquinas.....	11
5. Angiotensina II y respuesta inflamatoria.....	12
6. Sistema SRA y daño tisular, Papel de las Angiotensinas	
6.1 Angiotensina II.....	13
6.1.1 Angiotensina II y daño renal.....	14
6.1.2 Angiotensina II y daño vascular.....	14
6.2 Angiotensina III.....	16
7. Factores de Transcripción, SRA y daño tisular.....	16
7.1 Factor Nuclear de Transcripción κ B (NF- κ B)	17
7.2 Factor de Transcripción AP-1.....	19
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cultivos celulares	
1.1 Cultivo de células mesangiales glomerulares	22
1.2 Cultivo de células vasculares de músculo liso de aorta.....	22
1.3 Cultivo de células tubulares renales.....	22
1.4 Cultivo de células mononucleares humanas.....	23
2. Modelo experimental de infusión sistémica de Angiotensina II.....	23
3. Modelo experimental de obstrucción unilateral de uréter (UUO).....	24
4. Modelo experimental de nefritis por inmunocomplejos.....	24
5. Extracción de RNA celular y análisis por Northern blot.....	24
6. Análisis por RT-PCR.....	25
7. Determinación de la activación de los factores de transcripción	
NF- κ B y AP-1. (Ensayo de EMSA).....	25
7.1 Extracción de proteínas nucleares y citosólicas.....	25
7.2 Ensayo de unión.....	26
8. Técnica de Southwestern <i>in situ</i> (NF- κ B y AP-1).....	27
9. Técnica de Western blot.....	27

10. Ensayo de Inmunohistoquímica	
10.1 Inmunohistoquímica de células.....	28
10.2 Inmunohistoquímica de tejido.....	28
11. Análisis Microscópico.....	28
12. Anticuerpos utilizados.....	29
13. Estudio del Infiltrado inflamatorio.....	29
14. Ensayo de Quimiotáxis.....	29
15. Cuantificación de la síntesis de fibronectina. Ensayo de Inmunoprecipitación.....	30
16. Transfecciones transitorias y ensayo de luciferasa.....	30
17. Farmacología.....	31
18. Análisis estadístico y valoración de los resultados.....	31

RESULTADOS

I. ESTUDIOS *IN VIVO*

1. Efecto de la infusión de AngII a nivel renal.....	32
2. Papel de los receptores AT ₁ y AT ₂ en el daño renal inducido por AngII.....	35
3. La infusión de AngII activa el factor nuclear NF-κB en el riñón.....	35
4. Los antagonistas de los receptores AT ₁ y AT ₂ disminuyen la activación de NF-κB.....	38
4.1 Receptores implicados en la activación de NF-κB en situaciones de daño renal.....	41
5. La infusión de AngII activa el factor nuclear AP-1 a través del AT ₁ en el riñón.....	42
6. La AngII induce la producción de mediadores proinflamatorios en el riñón.....	44
6.1 La infusión de AngII aumenta la producción de TNF-α.....	44
6.2 La infusión de AngII aumenta la producción de otros mediadores de daño renal.....	45
7. Efecto de la infusión sistémica de AngII a nivel vascular. Activación de NF-κB.....	47
7.1 La infusión de AngII aumenta la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios en el vaso.....	48

II. ESTUDIOS *IN VITRO*

1. Localización de los receptores AT ₂ en el riñón y en células en cultivo.....	51
2. La Angiotensina II activa los factores AP-1 y NF-κB en células tubulares vía AT ₁	54
3. Efecto de la AngII en la activación de factores de transcripción en células implicadas en el daño renal.....	56
3.1 La Angiotensina II activa el NF-κB en células vasculares, mesangiales glomerulares y mononucleares vía AT ₁ y AT ₂	56
3.1.1 Papel del receptor AT ₂ en la activación de NF-κB. Estudio en células deficientes del receptor AT ₁	59
4. Estudio de los mecanismos moleculares asociados a la activación del NF-κB inducido por la AngII en células vasculares.....	62
4.1 La AngII induce la translocación del heterodímero p50/p65 al núcleo.....	62
4.2 La AngII induce la degradación de la subunidad inhibitoria IκB citosólica.....	64

4.2.1 Estudio de los niveles de I κ B α en células de ratón AT ₁ (-/-). Papel del AT ₂	66
4.3 Mediadores implicados en la ruta AngII/ NF- κ B. Divergencia entre los receptores AT ₁ y AT ₂	67
4.3.1 Papel de la Proteína Kinasa C (PKC).....	67
4.3.2 Papel de las Proteínas Tirosina-quinasa (PTK).....	68
4.3.3 Papel de los antioxidantes.....	68
4.3.4 Papel de las Proteínas Fosfatasas (PP2A)	70
4.3.5 Papel de las Ceramidas.....	70
5. Efecto de la AngII en la transcripción génica mediada por NF- κ B.....	70
5.1 Transcripción génica dependiente de NF- κ B; Ensayos de Transfección.....	70
5.2 Análisis de la expresión génica por Northern blot y RT-PCR.....	71
5.2.1 Efecto de la AngII en la expresión de MCP-1. Mecanismos y receptores implicados	71
5.2.2 Efecto de la AngII en la expresión de Angiotensinógeno.....	73
• ESTUDIO DEL PRODUCTO DE DEGRADACIÓN DEL SRA; LA ANG III, EN EL DAÑO RENAL	
6. Efecto de la AngIII en células mesangiales.....	75
6.1 Dosis-tiempo dependencia de la activación de NF- κ B inducida por AngIII. Papel de los receptores AT ₁ y AT ₂	75
6.1.1 Estudio del efecto de la AngIII en la activación de NF- κ B en células AT ₁ (-/-).....	77
6.2 Degradación de I κ B α inducido por AngIII. Comparación con la AngII. Papel de los receptores AT ₁ y AT ₂	78
6.2.1 Efecto de la AngIII en los niveles citosólicos de I κ B α en células AT ₁ (-/-).....	79
6.3 Papel de la AngIII en el reclutamiento celular.....	79
6.3.1 Efecto de la AngIII en la expresión de MCP-1.....	79
6.3.2 Producción y localización celular de MCP-1 inducido por AngIII o AngII.....	81
6.3.3 Efecto quimiotáctico del MCP-1 inducido por AngIII.....	82
7. Papel de la AngIII en la proliferación y fibrosis renal	
7.1 La AngIII regula la expresión del angiotensinógeno en células mesangiales.....	84
7.2 La AngIII induce la expresión del proto-oncogén c-fos.....	84
7.3 La AngIII regula la expresión de TGF- β y la síntesis de fibronectina.....	84
DISCUSIÓN.....	87
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	102
ABREVIATURAS.....	129

RESUMEN

RESUMEN

El sistema Renina-Angiotensina (SRA) está compuesto por diferentes péptidos (Angiotensinas) y enzimas de degradación altamente implicados en la patogenia del daño tisular. Hasta ahora se conocía la existencia de un SRA circulante donde la Angiotensina II (AngII) es el péptido efector. Sin embargo, se ha observado que además existe un SRA a nivel local (riñón, vaso, corazón) cuyos niveles se encuentran elevados en situaciones de daño tisular. Por otro lado, en diversas patologías se han encontrado niveles elevados en la actividad de factores de transcripción, como NF- κ B y AP-1, que regulan la expresión de determinados genes implicados en estos procesos.

En este trabajo hemos estudiado la hipótesis de que la AngII pueda comportarse como una verdadera citoquina proinflamatoria y profibrogénica. La infusión sistémica de AngII en ratas normales aumentó de forma significativa la actividad renal y vascular de NF- κ B y AP-1, la presión sanguínea, el daño tubular y el infiltrado inflamatorio. Además, las células infiltrantes presentaron complejos NF- κ B activados, lo que sugiere la participación de la AngII en la activación de las células inflamatorias. En riñón y aorta, la AngII aumentó la producción de mediadores implicados en el daño tisular como citoquinas (TNF- α), factores de crecimiento (CTGF) y agentes mitogénicos (PTHrP).

Cuando los animales se trataron con antagonistas de los receptores de angiotensina AT₁ o AT₂, se observaron respuestas diferentes. El antagonista AT₁ normalizó la presión arterial, disminuyó la actividad de NF- κ B en células glomerulares y tubulares, y disminuyó la actividad AP-1 en células renales, el daño tubular, la fibrosis y la producción renal de CTGF y PTHrP. El antagonista AT₂ disminuyó significativamente el infiltrado inflamatorio y la actividad de NF- κ B en células glomerulares e inflamatorias. Por otro lado, en células epiteliales tubulares en cultivo, la AngII aumentó la actividad de NF- κ B sólo vía AT₁, mientras que en células mesangiales, monucleares y de músculo liso vascular, ambos receptores, AT₁ y AT₂, participaron en este proceso. En cultivos de células epiteliales tubulares, la AngII activó el factor AP-1 a través del receptor AT₁.

Profundizando en los mecanismos de AngII/NF- κ B, estudiamos la composición del complejo de NF- κ B activado. En células vasculares, la AngII estimuló la activación del NF- κ B formado por las subunidades p50 y p65, y fue correlacionada con la degradación de la subunidad inhibitoria de NF- κ B, I κ B α . En otros experimentos, el agonista AT₂ p-aminofenilalanina⁶-AngII activó NF- κ B, aumentó los niveles nucleares de p65 y la transcripción de un gen reportero de NF- κ B, mientras que el antagonista AT₁ inhibió marcadamente la transcripción y la expresión de genes mediados por NF- κ B (Angiotensinógeno y MCP-1). En células mesangiales y vasculares obtenidas de ratones deficientes del gen del receptor AT₁, la AngII también activó NF- κ B. Ambos receptores AT₁ y AT₂ comparten señales intracelulares (radicales de oxígeno), sin embargo las tirosina quinasas sólo participan en la ruta AT₁/NF- κ B, y las ceramidas en la del AT₂/NF- κ B.

Nuestros resultados aportan nueva información sobre los mecanismos de señalización de la AngII y de la visión de este péptido como un mediador proinflamatorio.

Debido a que en situaciones de daño tisular en los órganos diana de la hipertensión se ha observado una elevación de los niveles de AngII y de enzimas degradativas, estudiamos si otros productos de degradación del SRA están implicados en estos procesos a través de la activación de NF- κ B. Estudios previos han descrito que la Angiotensina III, IV y (1-7) son péptidos con actividad biológica y potencialmente podrían participar en el daño tisular. En nuestros estudios, estos péptidos activaron NF- κ B con una respuesta similar a la AngII. Además, examinamos la implicación de la AngIII en el daño renal y sus mecanismos intracelulares. Mediante experimentos en ratones deficientes del receptor AT₁, y estudios farmacológicos con antagonistas de los receptores AT₁ y AT₂, observamos que en células mesangiales la AngIII estimuló la activación de NF- κ B (y degradación de I κ B α) a través de los mismos receptores que la AngII (aunque principalmente vía AT₂). Además, observamos que la AngIII está implicada en el desarrollo de la inflamación y fibrosis, ya que en células mesangiales regula la expresión de Angiotensinógeno, c-fos, TGF- β y fibronectina, de modo similar a la AngII, y estimula la síntesis de quimioquinas como el MCP-1, con actividad quimiotáctica para monocitos. En conclusión, estos datos indican la compleja participación del SRA en la patogenia del daño renal y vascular y dan una nueva visión de otros péptidos de este sistema en estos procesos.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA) está implicado en el control de las funciones cardiovasculares y renales, y actúa a nivel endocrino, paracrino y autocrino [1,2]. El SRA es capaz de controlar la presión sanguínea y el consumo de agua, a través de la liberación de la aldosterona, con lo que regula el volumen intravascular y la presión arterial sistémica.

El SRA está compuesto por un grupo de proteínas y péptidos. A partir de una proteína precursora (Angiotensinógeno) se irán generando los demás productos de degradación mediante transformaciones enzimáticas (figura A).

Además del SRA circulante, diversos estudios han demostrado la existencia de todos los componentes del sistema a nivel tisular, como en corazón, pared vascular, glándula adrenal, cerebro y riñón, donde actúan a nivel local e independiente del SRA circulante. El SRA circulante regula la homeostasis mientras que el SRA local está asociado a procesos patológicos tisulares [1-4].

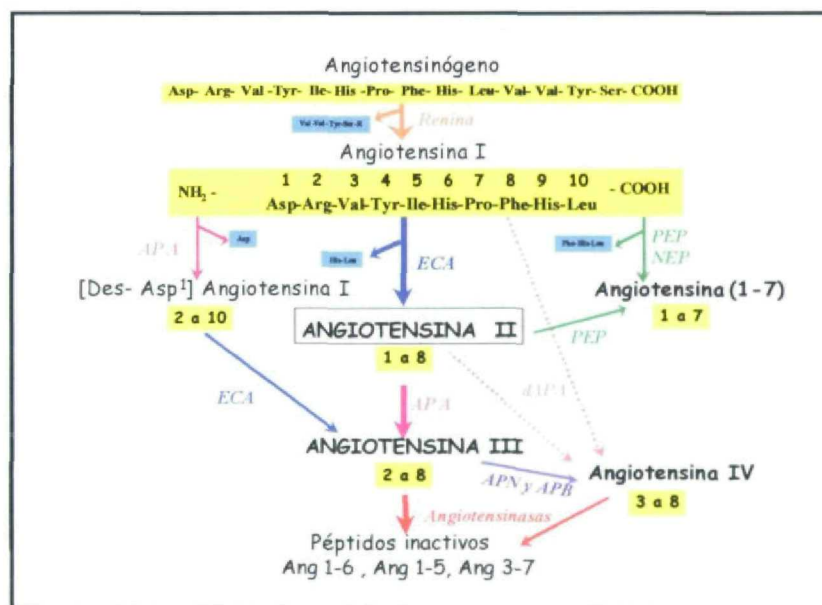


Figura A. Sistema Renina-Angiotensina (SRA). El SRA está compuesto por una serie de proteínas y péptidos generados por un procesamiento proteolítico a partir de un precursor; el Angiotensinógeno (Ao). Este se convierte en la Angiotensina I (AngI) por digestión enzimática de la renina. La AngI, por acción del enzima de conversión de angiotensina (ECA), da lugar a la Angiotensina II (AngII), el péptido efector de este sistema. La AngII puede ser degradada por diferentes proteasas específicas e inespecíficas (Angiotensinasas, NEP y PEP), originando distintos productos de degradación, la mayoría de ellos sin actividad biológica. Algunos de ellos, como la Angiotensina III (AngIII), Angiotensina IV (AngIV) y Angiotensina 1-7 (Ang(1-7)), se ha observado recientemente que podrían poseer una función biológica y estar implicados en procesos de daño tisular.

1.1 Componentes del SRA:

Todos los componentes del SRA incluyendo precursores, enzimas requeridas para la formación y degradación de angiotensinas (Angs), así como receptores de Angs, han sido descritos en multitud de órganos, así como a nivel circulante [1-6].

El Angiotensinógeno (Ao) es una glicoproteína con un peso de 56-60 KDa y compuesta por una secuencia de catorce aminoácidos unidos por el extremo C-terminal a un resto de azúcar. A nivel circulante es sintetizado por el hígado desde donde es liberado al torrente circulatorio. Sus niveles aumentan durante las infecciones y el daño tisular [7], y es inducido a largo plazo por glucocorticoides, hormona tiroidea y AngII. El Ao es la proteína precursora del SRA y sobre ella actúa la renina, una enzima glicoproteica producida en grandes cantidades por el aparato yuxtaglomerular del riñón (aunque existen otros múltiples sitios extrarenales que expresan su mRNA, como el sistema vascular, la glándula adrenal y el cerebro) [7-9]. Esta enzima, mediante su actividad aspartil-proteasa, libera los cuatro aminoácidos con el resto azucarado de la posición C-terminal del Ao, originando la [des-Asp¹]-AngI o Angiotensina I (AngI), un decapeptido que no presenta actividad biológica (figura A).

Sobre la AngI actúa la enzima convertidora de angiotensina (ECA, EC 3.4.15.1), la cual posee actividad dipeptidil-carboxipeptidasa capaz de separar grupos dipeptídicos del extremo carboxilo terminal de diversos polipéptidos, como son bradiquinina, sustancia P y neurotensina [10]. La ECA libera los dos aminoácidos C-terminales de la AngI para originar el principal péptido efector del sistema; la Angiotensina II (AngII) (figura A). Por todo ello la ECA juega un papel fundamental en la regulación del SRA y del sistema calcrenina-quinina, al convertir la AngI en AngII e inactivar la bradiquinina, respectivamente [11]. La ECA está ampliamente distribuida por el organismo. A nivel circulante, en el endotelio capilar del pulmón, y a nivel local, en diversos tejidos como riñón, cerebro, corazón, vasos sanguíneos y testículos, y además sus niveles se encuentran aumentados en situaciones de daño renal y vascular, tanto en pacientes como en modelos de experimentación animal [1-3,5]. Su síntesis es inducida por glucocorticoides, factores de crecimiento y por la inhibición crónica de la propia ECA [13].

La AngII es un octapéptido que posee una vida media relativamente corta, ya que es degradada rápidamente por varias peptidasas. Aunque la mayoría de sus metabolitos son inactivos, existen algunos con potencial actividad biológica (AngIII, AngIV, Ang(1-7)). La AngIII o des[Asp¹]AngII se genera por degradación enzimática de la Aminopeptidasa A (APA, EC 3.4.11.7) que elimina el aminoácido N-terminal de la AngII. *In vivo* se ha observado como la AngII es convertida a AngIII por la APA [15], la cual está expresada en glomérulo, túbulo proximal y a lo largo de las nefronas [16,17]. Existe una ruta diferente, aunque minoritaria, de obtención de AngIII, y se produce directamente a partir de la AngI por la APA y posteriormente por la ECA [18].

Todos los productos de degradación activos del SRA pueden transformarse mediante angiotensinasas hasta formas peptídicas inactivas, como las Angiotensinas 1-6 (Ang1-6), 1-5 (Ang1-5) o 3-7 (Ang3-7) [19]. Se ha demostrado que en situaciones patológicas, la concentración de enzimas proteolíticas aumenta por la acción de células mononucleares infiltrantes y de células residentes activadas. En diferentes situaciones patológicas se ha descrito una activación del SRA local. Por ejemplo, en pacientes cirróticos se ha demostrado una activación del SRA [20]. En enfermedades pulmonares obstructivas, se ha encontrado un aumento de los niveles de renina, AngII y receptores AT_1 y AT_2 [21]. A nivel cardiovascular se ha demostrado la presencia de todos los componentes del SRA, el cual contribuye al mantenimiento de la elevación presión sanguínea en procesos hipertensivos, y la AngII sintetizada localmente, provoca vasoconstricción, inflamación y altera la textura de las paredes de los vasos [22-24]. En pacientes con daño cardíaco se localizó un incremento de AngI, renina y AngII [25] y tras infarto de miocardio, se produce una hiperactividad simpática debida en gran parte a la activación del SRA [26]. Del mismo modo, en ratas hipertensas, también se ha observado una elevación de la actividad enzimática de la renina en riñón y corazón, donde los niveles de AngII están también aumentados [27].

2. Receptores de angiotensina

La AngII ejerce sus acciones biológicas mediante la unión a receptores específicos. El clonaje y la secuenciación de los receptores de AngII, así como el descubrimiento de antagonistas selectivos para cada subtipo, han permitido profundizar en el conocimiento de la biología de la AngII [28,29]. Existen al menos dos grandes subtipos de receptores de AngII, denominados AT_1 y AT_2 , que se diferencian por su unión a antagonistas, susceptibilidad a agentes reductores, y segundos mensajeros [28,29]. La mayoría de los efectos de las angiotensinas se deben a su interacción con el AT_1 , sin embargo se ha demostrado recientemente que el AT_2 podría tener un papel relevante en el desarrollo tisular [30]. Además de estos, recientemente se ha postulado sobre la existencia de otros receptores específicos para los péptidos de degradación de angiotensina. Se ha demostrado que la AngIV une con un receptor diferente a los anteriores denominado AT_4 [31] y la Ang(1-7) podría poseer un receptor específico por el cual provocaría respuestas celulares iguales o diferentes a los demás péptidos del SRA [32] (figura B).

El receptor AT_1 pertenece a una familia de receptores celulares caracterizados por poseer siete dominios transmembrana y estar acoplados a proteínas G. AT_1 posee la región amino terminal hacia el exterior de la membrana plasmática y es similar a los receptores de bradiquinina y vasopresina [28]. Este receptor contiene cuatro puentes disulfuro entre sus cisteínas sensibles a agentes reductores, y un Asp⁷⁴ crítico para la unión y trasducción de señal de la AngII [34]. El receptor AT_2 pertenece a una familia de receptores celulares caracterizados por poseer siete dominios transmembrana y estar acoplados a proteínas G, pero sin embargo activa proteínas fosfatasa [35]. La

secuencia genética de este receptor comparte sólo un 34% de homología con la del AT_1 . El receptor AT_2 se encuentra también en la membrana plasmática y contiene cinco sitios de glicosilación y catorce residuos de cisteína (tres de los cuales son comunes al AT_1 y se consideran esenciales para la unión a la AngII) [28].

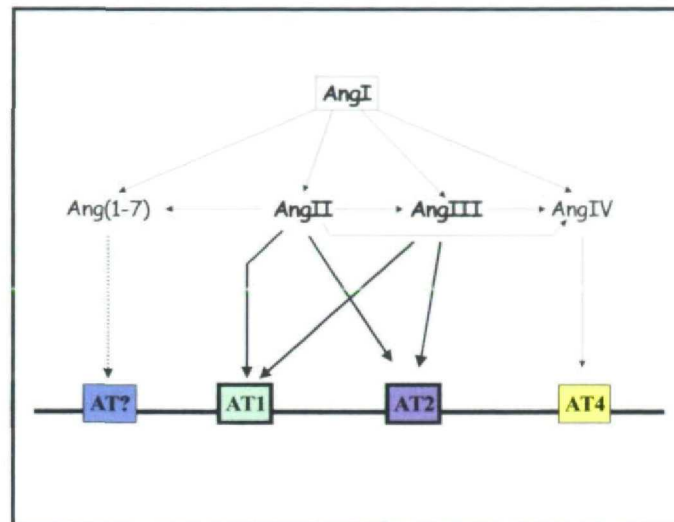


Figura B. Receptores de Angiotensinas. Se han descrito diferentes receptores específicos para la AngII y sus productos de degradación. La AngII y la AngIII pueden unirse específicamente tanto con el receptor AT_1 como con el AT_2 , que son los dos únicos tipos clonados. Otros péptidos del SRA poseen receptores específicos, como la AngIV que posiblemente interactúa con un receptor distinto a estos dos, denominado AT_4 . Se especula además que la Ang (1-7) podría interactuar con otro receptor específico distinto de los anteriores.

Durante el daño tisular existe un desbalance entre ambos receptores, y además se ha observado una sobreexpresión del AT_2 en nefritis, infarto de miocardio, hipertrofia cardíaca, infusión de AngII y deplección de sodio [36-39]. La existencia de herramientas farmacológicas y de biología molecular ha permitido profundizar en el esclarecimiento de las funciones fisiopatológicas de ambos receptores. El receptor AT_1 es utilizado principalmente por la AngII. La mayor parte de los efectos conocidos de la AngII, como vasoconstricción y regulación de la matriz extracelular, se producen a través del receptor AT_1 [40]. Participa en la hipertensión inducida por AngII, hipertrofia cardíaca y acumulación de matriz extracelular [28,29,36]. Se ha demostrado que la unión del AT_1 con AngII provoca movilización de calcio y activación de tirosin-quinasas [41]. Además AT_1 presenta diferentes isoformas en rata y ratón, denominadas AT_{1A} , AT_{1B} y AT_{1C} , aunque en riñón y en vaso la isoforma AT_{1A} es la predominante [42]. Por otro lado, algunas de las acciones de la AngII pueden ser mediadas por ambos receptores AT_1 y AT_2 , como la liberación de NO, síntesis de colágeno y activación de los α -adrenoreceptores [43-45].

El receptor AT_2 media efectos tróficos vasculares y la vasodilatación dependiente del endotelio [46,47]. Mediante el tratamiento con el ligando AT_2 , CGP42112, y por

sobreexpresión del AT_2 , se ha demostrado que los receptores AT_2 están asociados a la inhibición de la proliferación y a la formación de la neointima después del daño vascular [47].

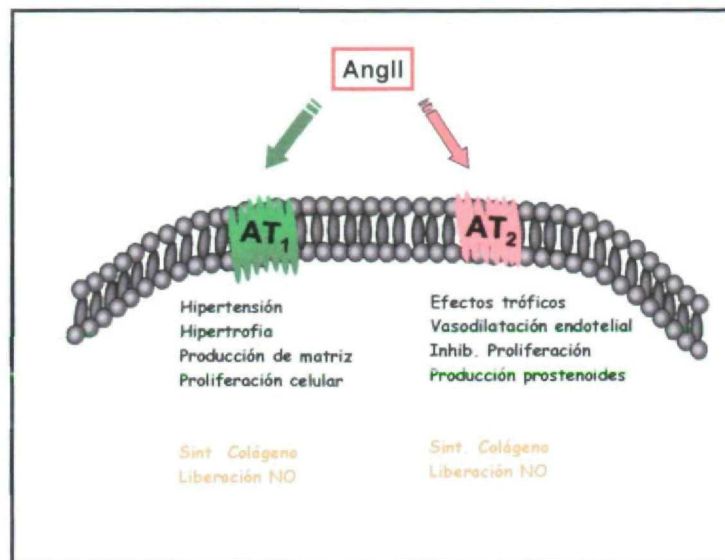


Figura C. Respuestas celulares de los receptores AT_1 y AT_2 inducidos por AngII.

Se ha demostrado que al menos la AngII y la AngIII son capaces de unir con el AT_2 en células renales y vasculares [48]. El mRNA del AT_2 se expresa en el riñón fetal, en bajos niveles en el adulto y se reexpresa en situaciones patológicas asociadas al remodelamiento tisular [36-38]. Este receptor, a nivel renal puede activarse por deplección de sodio o administración de AngII [36,38]. En estudios recientes se sugiere que el AT_2 participa en funciones previamente atribuidas al AT_1 , como la regulación de la presión sanguínea, y efectos tróficos vasculares [36,46,47]. Además, se ha demostrado su implicación en respuestas de control de crecimiento y muerte celular [51]. Por lo tanto es posible que acciones propias de este receptor como antiproliferación o apoptosis puedan contrarrestar el crecimiento mediado por el receptor AT_1 (figura C).

3. Farmacología del sistema SRA

La hipertensión arterial es la enfermedad más frecuente en el hombre, se calcula que la padece alrededor del 30% de la población. Es un trastorno multisistémico que afecta sobre todo al corazón, riñón, cerebro y ojos. Cuanto más elevado es el nivel de presión arterial, mayor es la probabilidad de aparición prematura de diversas complicaciones como la aceleración del proceso de arteriosclerosis o hemorragias cerebrales. De no tratarse adecuadamente, casi la mitad de los pacientes hipertensos morirán, por enfermedades isquémicas cardíacas y cerebrovasculares, y entre el 10 y 15% por nefropatía. Los pacientes con daño vascular o hipertensión tienen una mayor probabilidad de sufrir eventos cardiovasculares y una alta morbilidad. Otra de las

consecuencias de la hipertensión es el daño renal. Los pacientes hipertensos, si no son tratados, terminan sufriendo fracaso renal y tienen que ser sometidos a programas de diálisis y trasplante renal.

Se ha demostrado que en diversas enfermedades renales, independientemente de la presencia de hipertensión sistémica, presentan un SRA tisular activado. Una de las terapias utilizadas en clínica para estas enfermedades es el empleo de fármacos que bloquean el SRA, como los inhibidores de la ECA (iECAs) o los antagonistas de los receptores AT_1 . Los iECAs inhiben la actividad de la enzima ECA, capaz de transformar la AngI en AngII, mientras que los antagonistas AT_1 actúan bloqueando la unión de las angiotensinas con el receptor AT_1 .

Desde el punto de vista farmacológico, es interesante conocer si los inhibidores de la ECA y los antagonistas del receptor AT_1 tienen efectos similares en el control de la hipertensión arterial y de la protección de los órganos diana. En diversos estudios publicados (como SOLVD Y ELITE) se ha observado como ambos fármacos son comparables en la reducción de la presión sistémica y la proteinuria, aunque no se conoce aún muy bien si los antagonistas del receptor AT_1 pueden proteger riñón, vaso y corazón a largo plazo.

3.1. Inhibidores de la ECA:

Los iECAs al inhibir esta enzima, bloquea la generación de AngII local y circulante, aumentando los niveles de AngI, la cual puede desviarse hacia la formación de otros péptidos de degradación, principalmente la Ang(1-7) [52]. Estos péptidos podrán unir con receptores de angiotensina y provocar idénticas o diferentes respuestas celulares. Además, los iECAs inducen la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas al bloquear la degradación de bradiquininas [53] (figura D).

Mediante el bloqueo farmacológico de la AngII se consigue no sólo disminuir la presión sanguínea, con reducción del estrés celular y oxidativo, y procesos turbulentos de la pared vascular, sino que además, habrá menor estimulación directa o indirecta de la restructuración y remodelamiento del sistema cardiovascular [54].

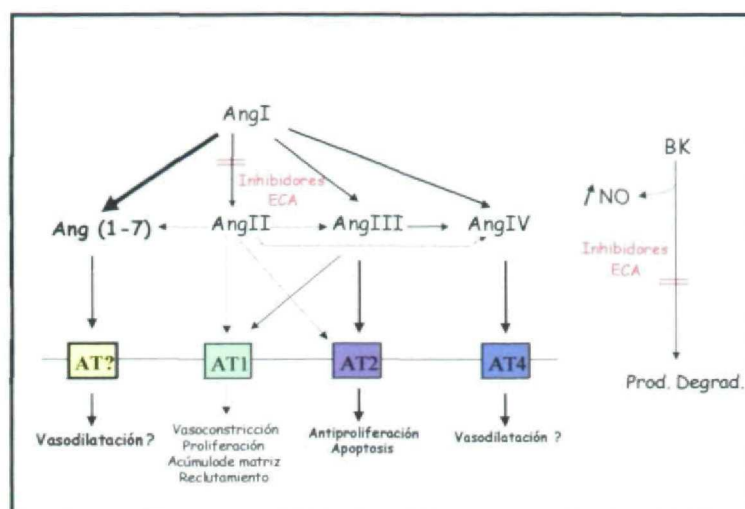


Figura D. Efecto del bloqueo con inhibidores de la ECA (iECAs). Los iECAs inhiben la actividad de la ECA con lo que se interrumpe la conversión de AngI a AngII. El SRA tan sólo podrá actuar a través de los otros péptidos de degradación (Ang(1-7), AngIII, AngIV). Además, los iECAs bloquean la degradación de las bradikinas, aumentando la síntesis de NO

3.2 Antagonistas del receptor AT_1 :

Con el empleo de los antagonistas del receptor AT_1 , todas aquellas respuestas celulares que se deben a la activación de este receptor, como son la proliferación, crecimiento, reclutamiento celular, control de la presión sanguínea y el balance de agua-electrolitos [28,29], se encuentran significativamente disminuidas. El tratamiento con AT_1 antagonistas causa una elevación de la AngII local y circulante, la cual podría unirse a los receptores AT_2 y producir efectos, aunque hasta ahora desconocidos, teóricamente importantes a nivel clínico [40]. Además, la AngII permanece más tiempo expuesta a sus enzimas proteolíticas que la pueden transformar en fragmentos inactivos o activos como la AngIII, los cuales podrían interactuar con otros receptores no bloqueados (figura E). Las funciones biológicas y las señales intracelulares del AT_2 no se han demostrado completamente. El conocimiento de las posibles acciones biológicas de otros metabolismos del SRA, así como el tipo de receptor utilizado, podría tener gran importancia en el empleo de uno u otro fármaco en el tratamiento de enfermedades renales y vasculares.

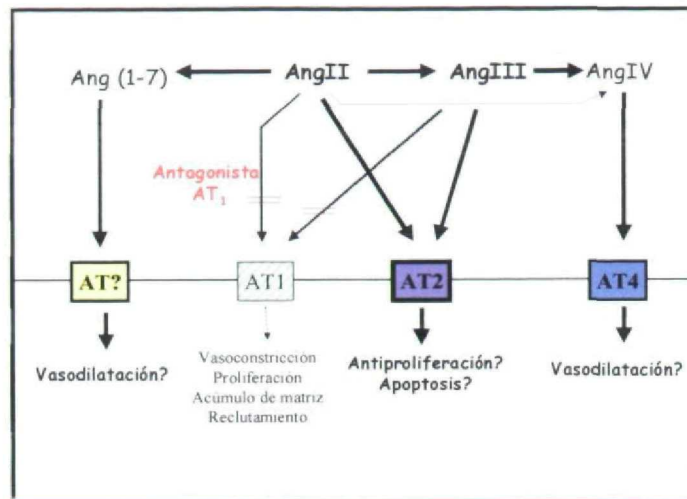


Figura E. Efecto del bloqueo con antagonistas específicos del receptor AT_1 . Los antagonistas del receptor AT_1 compiten con las angiotensinas por la unión al receptor AT_1 . De este modo, todas las respuestas asociadas a su activación, se verán inhibidas. La AngII podría unirse a otros receptores (AT_2) o degradarse a otros metabolitos activos del SRA (como la AngIII), que podrían unir con otros receptores no bloqueados.

Los mecanismos del efecto divergente de ambos fármacos no son bien conocidos. En un modelo de obstrucción ureteral unilateral, la administración de un iECA, pero no de un antagonista del receptor AT_1 , disminuyó el infiltrado de células mononucleares en el parénquima renal [55]. El tratamiento con iECAs produce un efecto beneficioso en enfermedades renales [3]. La investigación de los mecanismos moleculares de la AngII a nivel renal, de sus productos de degradación (como la AngIII), de los receptores implicados y de las estrategias terapéuticas, puede suponer una mejora en la calidad de vida de estos pacientes.

4. Características del daño renal:

En diversos modelos experimentales de daño renal, al igual que en nefritis crónicas humanas, las características principales son la proliferación celular, el acúmulo de matriz extracelular y el reclutamiento de células circulantes al foco inflamatorio [3-6]. Existen tres tipos celulares implicados activamente en estos procesos del daño renal, como son las células mesangiales, tubulares epiteliales, y mononucleares infiltrantes.

Se ha demostrado que en enfermedades que cursan con daño glomerular, como en glomerulonefritis, se producen cuadros de hiper celularidad debida a la proliferación celular intrínseca y a la infiltración de células mononucleares. Además, se produce proliferación de células inflamatorias, y un incremento en la producción extracelular de matriz, debido al daño en uno o más tipos de células glomerulares (epiteliales, mesangiales) [60]. Las lesiones glomerulares normalmente van acompañadas de un incremento en la permeabilidad capilar, lo cual se manifiesta

clínicamente en proteinuria, y consecuentemente se presentan anomalías hemodinámicas [60]. Dependiendo de la gravedad y estado de la enfermedad, esas complicaciones pueden disminuir o aumentar el flujo glomerular sanguíneo, la tasa de filtración y la presión hidrostática. Finalmente, esa disfunción vascular y tubular eventualmente progresa a fibrosis intersticial y atrofia tubular, respectivamente [60].

4.1 Células Mesangiales Glomerulares:

Las células mesangiales se encuentran en los glomérulos de las nefronas de la corteza renal y están directamente involucradas en las enfermedades renales. Estas células proporcionan el soporte estructural necesario para los capilares. Son capaces de liberar diversas citoquinas como $\text{TNF}\alpha$, CSF-1, IL-1 o IL-6, quimioquinas como IP-10 o MCP-1, y factores de crecimiento como PDGF, EGF o $\text{TGF}\beta$ [59,61]. A su vez, las células mesangiales sintetizan y degradan componentes de matriz, como fibronectina, trombospondina, Colágeno I, III, IV y VIII, y generan agentes vasoactivos como la renina, ET-1, PAF y prostaglandinas [62,155].

Las células mesangiales son también capaces de controlar la filtración glomerular gracias a su capacidad de contracción y relajación mediante cambios en el área disponible para el paso de los solutos [63,64]. Existen diversos agentes que producen su contracción, como pueden ser la AngII, ET-1, tromboxano A_2 , inmunocomplejos, vasopresina, PDGF, PAF, e incluso citoquinas como IL-1 e IL-6 [63,65]. A su vez, existen otros estímulos capaces de provocar su relajación, como pueden ser las prostaglandinas, el óxido nítrico, las bradiquininas y el ANF [121,155].

4.2 Células Tubulares Epiteliales:

Las células tubulares están implicadas en la enfermedad renal [62]. Regulan la entrada y salida de solutos del túbulo en el proceso de formación de la orina. Se ha demostrado que estas células expresan mediadores inflamatorios (citoquinas, quimioquinas), componentes de matriz y factores de crecimiento, posibles agentes involucrados en la progresión del daño renal [62]. En estas situaciones las células tubulares juegan un papel activo, ya que al ser dañadas por diferentes mecanismos, son capaces de atraer células inflamatorias, estimulando la fibrosis intersticial, y comenzando a sufrir procesos de apoptosis [62].

4.3 Células monocíticas y quimioquinas.

El reclutamiento de monocitos/macrófagos en el riñón debido a la liberación de factores quimiotácticos por células residentes e infiltrantes es un hecho importante en la inducción y progresión del daño renal [5,69]. Se han encontrado niveles elevados de quimioquinas en gran parte de enfermedades inflamatorias por lo que se ha sugerido la importancia de estas moléculas en el reclutamiento celular

en enfermedades renales [69]. La proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1) es la principal quimioquina atrayente de monocitos/macrófagos en el riñón [69]. Mediante el empleo de anticuerpos anti-MCP-1 se ha observado que disminuye el infiltrado inflamatorio de monocitos/macrófagos en el glomérulo de riñones con nefritis nefrotóxica [249].

5. Angiotensina II y la respuesta inflamatoria

Existen muchas evidencias que relacionan el sistema SRA con las células inflamatorias. Los receptores AT_1 y AT_2 han sido previamente descritos en células circulantes [189]. La AngII regula respuestas inflamatorias celulares. Se ha observado que la AngII es un factor quimiotáctico para células mononucleares, neutrófilos, y linfocitos T y B [74,75]. La AngII además estimula la fagocitosis de macrófagos del granuloma [76], y los inhibidores de la ECA bloquean la proliferación de células hematopoyéticas [77]. La AngII actuando a través del AT_1 en células inmunes, estimula la proliferación de linfocitos mediada por la activación de calcineurina [78], demostrando así que la modulación de la proliferación en células inmunes podría ser una de las importantes funciones del SRA.

Además, la AngII participa en otro evento fundamental del proceso inflamatorio: el reclutamiento de células proinflamatorias al tejido dañado. En células residentes, la AngII aumenta la permeabilidad vascular a través de prostaglandinas y el factor de crecimiento VEGF, lo cual inicia la respuesta inflamatoria [79]. La AngII provoca la adhesión de monocitos y neutrófilos a células endoteliales y mesangiales [80-82], y sobreexpresa *in vivo* e *in vitro* moléculas de adhesión como P-selectina, ICAM-1, y VCAM-1, en células renales, endoteliales y vasculares [83]. En leucocitos de ratones dobles transgénicos de renina y angiotensinógeno se encontraron niveles elevados de ICAM-1 y VCAM-1, así como de sus ligandos las integrinas $\alpha\beta_2$ y $\alpha\beta_1$ [84,85]. En humanos, el bloqueo del SRA disminuye la expresión de moléculas de adhesión [86,87], y en ratas hipertensas, el tratamiento con antagonistas del AT_1 , pero no con agentes vasodilatadores como hidralacina, disminuye el daño endotelial y el número de monocitos activados y adheridos al endotelio [88]. Todos estos datos muestran que la AngII participa en el reclutamiento de células infiltrantes en el tejido a través de la activación directa de células inflamatorias o vía regulación de la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas por las células residentes.

Las quimioquinas son pequeñas proteínas con propiedades quimioattractantes. En células renales y vasculares se ha observado gran variedad de estímulos como citoquinas y AngII que son capaces de inducir la expresión de MCP-1 [5,89,90]. Otras quimioquinas son también inducidas por AngII, como IL-8 e IP-10 [90,91], las cuales poseen propiedades quimioattractantes y activadores de neutrófilos. Se ha demostrado que los iECAs poseen propiedades moduladoras y pueden disminuir el número de citoquinas proinflamatorias [92]. En pacientes hipertensos se ha

observado activación de monocitos circulantes y niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 y TNF α [94]. El papel de la AngII en la producción de citoquinas no ha sido aún bien estudiado. En macrófagos la AngII sobrerregula la expresión de TNF α e IL-6 [95], y en células vasculares, la AngII aumentó la expresión de IL-6 a través de la activación de factores de transcripción y producción de radicales de oxígeno [96,97]. *In vitro*, los iECAs y antagonistas del AT $_1$ poseen potentes efectos inhibitorios de la producción de citoquinas y lipopolisacáridos [98], pero aún no se conoce bien lo que sucede *in vivo*. Los iECAs suprimen la producción de IL-12, la cual es una citoquina esencial en la inmunidad celular [99], y provocan la liberación de histamina de los mastocitos [100]. En un modelo de trasplante de corazón en ratones AT $_1$ (-/-), se observó un marcado incremento en el efecto inmunosupresor de la ciclosporina [78]. Además, los antagonistas del receptor AT $_2$, atenuaron la fiebre provocada por la IL-1, y modularon el efecto estimulador del NO inducido por LPS, IL-1 e IFN [101,102], sugiriendo que la ruta AngII/AT $_1$ puede tener un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune intracerebral. Todos estos datos sugieren que la inhibición de los efectos de la AngII puede ser válida como una terapia antiinflamatoria, antialérgica e inmunosupresora.

6. Sistema SRA y daño tisular. Papel de las Angiotensinas

6.1 Angiotensina II:

La AngII, el principal péptido efector SRA, juega un papel clave en las patologías cardiovasculares y renales, y en la etiología de la hipertensión en humanos [1-3]. Este péptido vasoactivo es un factor de crecimiento que regula la expresión génica de varias sustancias con actividad biológica (componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, etc.) [1-6]. Sin embargo, los mecanismos moleculares de acción de la AngII, así como los receptores utilizados, no han sido totalmente esclarecidos.

La AngII es una potente neurohormona capaz de regular la presión sanguínea y la estructura vascular a través del sistema endocrino [1]. También está implicada en la producción de matriz extracelular y en la síntesis de factores quimiotácticos [3,5]. En situaciones de estrés celular y oxidativo, así como en sucesos turbulentos del torrente circulatorio como ocurre en miocardio y glomérulo, se ha demostrado un aumento local de los niveles de AngII [36]. La AngII interviene en la regulación de la contractilidad cardíaca a través del sistema nervioso simpático [6,28]. Además, en procesos de reestructuración tisular, como en pacientes con nefropatía diabética, infarto posmiocardial, aterosclerosis y en avanzado grado de daño cardíaco, también se origina un aumento de AngII como mecanismo de respuesta [28,36].

6.1.1 Angiotensina II y daño renal:

La AngII actúa como un factor de crecimiento renal al regular el crecimiento de células renales; proliferación/ hipertrofia/apoptosis de células mesangiales, tubulares y fibroblastos intersticiales [4-6,66]. *In vivo*, en varios modelos de daño renal, el bloqueo de las acciones de la AngII con el tratamiento de inhibidores de la ECA (iECAs) o con antagonistas de sus receptores AT₁, mejora la evolución clínica de la enfermedad, disminuyendo las lesiones renales y el infiltrado de células mononucleares [3].

En cultivos de células renales se ha observado que la AngII posee un claro efecto hipertrófico o proliferativo, dependiendo de las condiciones de cultivo [3]. En cuanto al efecto de la AngII sobre la regulación de la matriz extracelular, se ha demostrado que estimula la síntesis de proteínas de matriz, como fibronectina y colágenos I y IV, en diversos tipos celulares como células mesangiales, epiteliales tubulares y fibroblastos intersticiales [4-6,66,103,121].

6.1.2 Angiotensina II y daño vascular:

La estructura y función de la pared vascular son dependientes del balance de varios factores interactuando, como por ejemplo vasoconstricción/vasodilatación, estimulación del crecimiento frente a inhibición, y proapoptosis/antiapoptosis. En vaso sano, estos factores están equilibrados, sin embargo, bajo condiciones patológicas, este balance es desequilibrado, resultando en el desarrollo de estados proaterogénicos. De modo similar, procesos involucrados en el mantenimiento de las estructuras y funciones de la pared del corazón, están bajo un estrecho control, y cuando están desregulados, esto puede resultar en hipertrofia ventricular, con disminución de la función cardíaca y desarrollo del fallo cardíaco. Diversas evidencias sugieren que la AngII actuando vía AT₁ y AT₂, juega un papel importante en la regulación de la estructura y función del corazón y pared vascular [36,43,45]. Bajo condiciones patológicas, la capacidad del corazón y la pared vascular por generar AngII está aumentada debido al incremento de los niveles de expresión de la ECA [6,36,54].

Se ha demostrado que la AngII media diferentes procesos como hipertensión, hipertrofia y remodelamiento vascular [54,104]. El tratamiento prolongado con iECAs disminuye la presión sanguínea en ratas normotensas e hipertensas, y en hipertensión humana, el tratamiento con estos fármacos produce una sustancial regresión de la hipertrofia cardiovascular [36]. La presencia de hipertensión acelera la progresión de procesos como la aterosclerosis. La AngII promueve la aterosclerosis al inhibir la apoptosis celular, incrementar el estrés oxidativo, la adhesión y producción de leucocitos, y estimular la trombosis [54]. En pacientes con placas de ateroma, se ha observado una colocalización de la ECA, AngII y receptores AT₁ sugiriendo un papel de la AngII local en aterogénesis [105,106]. Algunas evidencias prueban que la AngII está implicada en diferentes pasos del desarrollo de la aterosclerosis como disfunción endotelial, proliferación y migración de células

vasculares y oxidación de LDL. Además interviene en la migración y crecimiento de células vasculares, activa macrófagos e incrementa la agregación plaquetaria [54]. Aumenta la densidad y sensibilidad de otros receptores de factores de crecimiento como TGF β , IGF y PDGF [106]. Además por otro lado, la AngII puede estimular la liberación desde las células vasculares a la matriz extracelular de metalo-proteinasas [107], las cuales poseen la propiedad de degradar proteínas de matriz y por lo tanto participan en la desestabilización de la placa de ateroma y en el desarrollo del síndrome coronario (figura F).

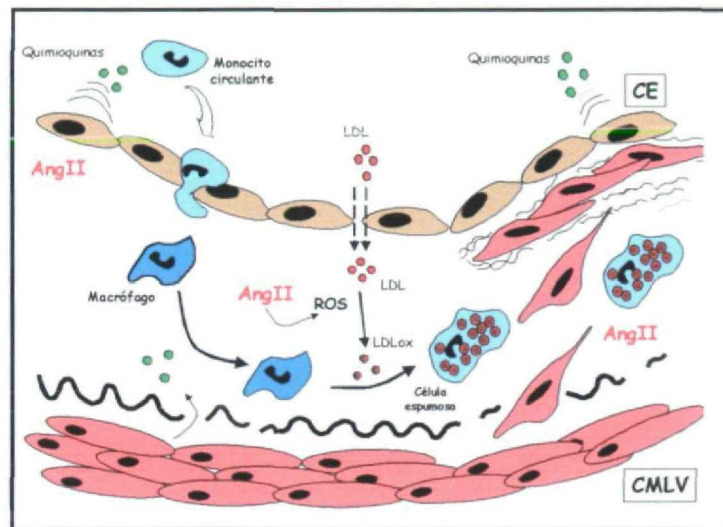


Figura F. Angiotensina II y daño vascular. La AngII interviene en varios estadios de la enfermedad vascular como aterosclerosis. Induce la producción de quimioquinas en células endoteliales (CE) y vasculares (CMLV), promueve la diferenciación de monocitos a macrófagos, produce radicales de oxígeno (ROS), estimula la proliferación y migración de las células vasculares, e induce la producción de matriz extracelular y metaloproteinasas desde células vasculares.

Se ha demostrado que los iECAs poseen efectos anti-aterogénicos en conejos hiperlipidémicos y en otros modelos de ratones deficientes en la lipoproteína ApoE. En un modelo de aterosclerosis, la inhibición de la ECA disminuyó las células inflamatorias y la expresión de quimioquinas en la lesión [70,90]. En ratas hipertensas, la presencia de monocitos/macrófagos en la pared vascular fue reducido por iECAs [109]. Inicialmente este efecto beneficioso fue atribuido a la reducción de la presión sanguínea o a la oxidación de las LDL, pero datos recientes sugieren que puede ser atribuido al bloqueo de las acciones de la AngII. Recientemente el tratamiento con antagonistas AT₁ en monos hipercolesterolémicos, disminuyó la lesiones ateroscleróticas y los niveles séricos de MCP-1 y de moléculas de adhesión CD11 en monocitos [110]. En otros estudios, el tratamiento con iECAs redujo la acumulación de lípidos en el desarrollo de placas ateromatosas en carótidas, donde el antagonista AT₁ no tuvo ningún efecto [111].

6.2. Angiotensina III:

La AngIII es un heptapéptido que posee la mayoría de las propiedades de la AngII. Es particularmente importante en el cerebro y glándula pituitaria, y juega un papel fundamental en la secreción de arginina-vasopresina [15]. Al igual que la AngII, es un péptido efector del SRA cerebral, participando en el control de la presión sanguínea y en el consumo de agua [112]. A nivel cardiovascular la AngIII regula la presión sanguínea al promover la contracción de las células musculares y presenta una eficacia similar a la AngII en la vasoconstricción de la aorta [15,113]. Recientemente se ha descrito que varias acciones atribuidas a la AngII podrían ser debidas a algunos de sus péptidos de degradación. Por ejemplo, el efecto de la AngII en la liberación de vasopresina depende de la conversión de AngII a AngIII por la enzima APA [114]. En situaciones patológicas asociadas a la activación del sistema SRA se ha encontrado un aumento de los niveles de APA en glomérulo de ratas diabéticas, con nefritis, hipertensas y tras infusión de AngII [115]. En tumores de cerebro y en procesos de neovascularización de microvasos se ha observado una sobre-producción de APA [116]. Además de todas las enzimas específicas, existe un incremento de diversas proteasas inespecíficas capaces de romper la AngII desde ambos extremos N y C-terminales [117] y como consecuencia, la AngII sólo representa un 5-15% del total de Angs que atraviesan el túbulo proximal [118]. Este aumento de enzimas específicas e inespecíficas, unido a una mayor presencia de AngII en situaciones de daño tisular, sugieren un posible papel de otros péptidos del SRA, como la AngIII en estos procesos. Es por tanto posible, que parte de las acciones de la AngII puedan ser debidos a los efectos biológicos de sus fragmentos de degradación, como la AngIII. Sin embargo, el papel potencial de este péptido en los fenómenos asociados al daño tisular, así como sus mecanismos y receptores involucrados, no han sido establecidos.

7. Factores de Transcripción, SRA y daño tisular.

Los factores de transcripción son proteínas capaces de unirse a secuencias específicas del DNA, localizadas en el promotor de multitud de genes, e inducir su transcripción. La activación de factores de transcripción es un paso crítico en la traducción de señales al núcleo y se ha demostrado la activación de algunos factores de transcripción en situaciones de daño tisular [119]. En experimentos en nuestro laboratorio observamos como en un modelo de aterosclerosis [70] y en otro de nefritis por inmunocomplejos [5], existía un incremento de la activación del factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B). En ambos modelos, el tratamiento con iECAs disminuyó a niveles basales esta activación. En situaciones de daño hepático se ha encontrado un incremento de activación de c-fos y NF- κ B [122]. En intestino, en estados de hibernación donde se dan situaciones de estrés oxidativo, se produce un aumento de NF- κ B [123]. En procesos de isquemia, se produce una activación del factor Egr-1 [124], el cual también se ha observado aumentado tras el daño agudo cardíaco como mecanismo de reparación tisular [125]. En situaciones de isquemia y

reperusión se ha demostrado una activación de c-fos en células cardíacas [126], y en cerebro se ha sugerido que el NF- κ B podría inducir la muerte neuronal en procesos de isquemia cerebral ya que el tratamiento con antioxidantes bloquea este proceso [127].

En células mesangiales, la AngII activa factores de transcripción como la proteína de unión en respuesta al AMP cíclico (CREB), SP-1, Egr-1, la proteína activadora-1 (AP-1) y el NF- κ B [129,130]. En células de músculo liso vascular, la AngII activa también AP-1 [117], CREB [133], NF- κ B [5,70], y las proteínas STAT [134]. La activación de NF- κ B u otros factores se ha relacionado con la expresión de genes relacionados con el daño tisular. En monocitos, algunos virus son capaces de aumentar la producción de citoquina IL-10 o IL-8 a través de la activación de NF- κ B [135]. En estas células se ha demostrado una activación de NF- κ B y expresión de genes proinflamatorios debido a la ingesta de dietas ricas en grasas [136] y al aumento de LDL [137]. En células tubulares humanas, en situaciones de hipoxia se produce un aumento de NF- κ B [131]. En estados de proteinuria tubular intersticial se reduce el infiltrado inflamatorio de monocitos con el tratamiento de antioxidantes que inhiben la activación de NF- κ B [139], y en células tubulares (MCTs) la expresión de VCAM-1 se realiza vía activación de NF- κ B [140]. En ratas proteinúricas, la inhibición de NF- κ B reduce el daño tubulointersticial [132].

7.1 Factor Nuclear de Transcripción κ B (NF- κ B):

El NF- κ B es un factor de transcripción que originalmente se describió como una proteína capaz de unirse a una pequeña secuencia del DNA (denominado sitio κ B) para inducir la expresión del gen de la inmunoglobulina κ de las células B sanguíneas [141]. Posteriormente se ha visto que existe una gran variedad de genes inducibles que posee este sitio κ B en sus regiones promotoras, en diferentes tipos celulares. Además se han descrito multitud de estímulos capaces de inducir la activación de NF- κ B, como son citoquinas, factores de crecimiento, estrés celular, virus, agregados de IgG y AngII [5,56,70,147,188,195] (figura G).

El NF- κ B es un complejo proteico que puede estar compuesto por varias subunidades formando homo o heterodímeros. Estas subunidades pertenecen a una gran familia de polipéptidos denominada NF- κ B/Rel/Dorsal. Existen dos subclases dentro de esta familia, una de ellas, distinguida por su procesamiento proteolítico desde formas precursoras, y por no poseer dominios de activación, incluye las proteínas p50 (NF- κ B1) y p50B (NF- κ B2, p52). La otra subclase, caracterizada por poseer dominios de activación, está formada por las subunidades proteicas p65 (RelA), RelB, c-Rel, v-Rel y la proteína Dorsal de *Drosophila* [142]. Aunque el heterodímero p50/p65 es el mayoritario en la formación del complejo NF- κ B, existen otros homo y heterodímeros con propiedades reguladoras de la unión al sitio κ B del DNA [143]. Todos los componentes de esta familia poseen una región de homología, responsable del reconocimiento y unión al DNA, de la dimerización, localización nuclear y la interacción con la subunidad inhibitoria I κ B [144].

NF- κ B reside en el citoplasma celular como un complejo inactivo estabilizado por la unión a la subunidad inhibitoria I κ B, responsable de anclarse al complejo de NF- κ B e impedir la translocación del complejo al núcleo [144]. Se han descrito al menos cinco isoformas de esta subunidad inhibitoria; I κ B α , β , γ , BCL $_3$ y MAD3, aunque la más abundante y estudiada ha sido la subunidad α . La activación de este factor de transcripción se produce tras la liberación de su subunidad I κ B, al ser fosforilada en un resto de serina por la acción de una enzima tirosin-quinasa citosólica, permitiéndose así la translocación de NF- κ B al núcleo (figura G) [144]. Después, la subunidad I κ B fosforilada que permanece en el citosol, es degradada por una proteasa (del complejo del proteosoma) hasta fragmentos peptídicos [144]. Previamente se ha demostrado que la fosforilación de I κ B *in vitro* por proteínas kinasas A y C, induce la unión del NF- κ B con el DNA [142,143].

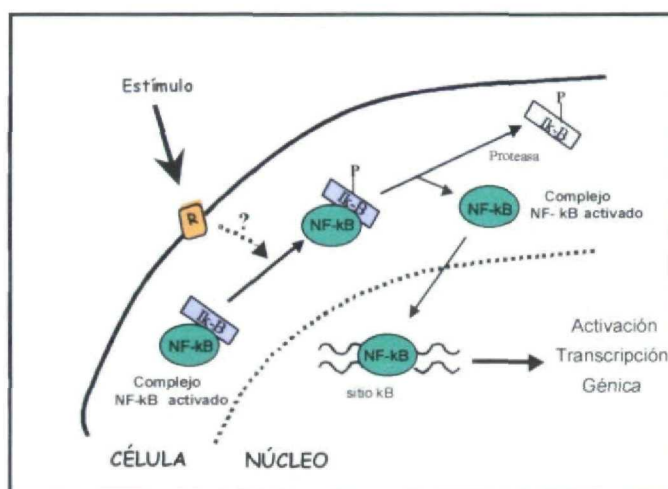


Figura G. Mecanismo de activación del NF- κ B. Al llegar el estímulo a la célula, la subunidad inhibitoria I κ B se fosforila y deja libre al complejo NF- κ B, formado por diferentes subunidades. Este homó o heterodímero se transloca al núcleo para unirse allí a secuencias específicas del DNA e inducir la activación de determinados genes, mientras que la subunidad I κ B es degradada mediante enzimas proteolíticas en el citosol.

Finalmente, una vez que entra el complejo NF- κ B en el núcleo, se une a secuencias específicas localizadas en el promotor de diversos genes con el fin de activar su transcripción [142]. Existe un mecanismo de autorregulación de este proceso ya que el promotor del gen de las propias subunidades p50, p65 e I κ B, posee un sitio κ B [144]. Se ha demostrado que la translocación del complejo de NF- κ B al núcleo, induce altos niveles de síntesis de I κ B, lo cual puede restaurar la cantidad de esta subunidad inhibitoria en el citosol [144].

factores de transcripción incrementan los niveles de c-fos, por lo que se sugiere que podría poseer un papel muy importante, aunque no esencial, en procesos de proliferación. En este sentido, ratones homocigotos c-fos (-/-) tienen un crecimiento retardado y desarrollan osteoporosis en fases tempranas [151]. Sin embargo, la subunidad c-jun es considerada imprescindible en los procesos proliferativos. Es el componente principal de los complejos de AP-1 y juega un papel fundamental en el desarrollo [148]. Se ha observado que ratones c-jun (-/-) mueren a mitad de gestación [152]. Esta subunidad es requerida además para la diferenciación de fibroblastos y está relacionada con la regulación del ciclo celular, matriz extracelular y procesos de apoptosis [152]. C-jun es expresada en bajos niveles en muchas células, y esta expresión es inducida por muchos estímulos como factores de transcripción, citoquinas e irradiación ultravioleta [152].

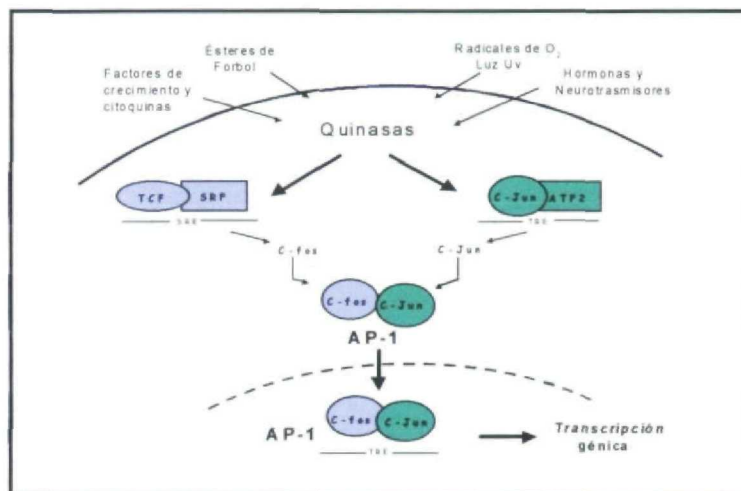


Figura I. Activación del factor de transcripción AP-1. El factor nuclear AP-1 está compuesto principalmente de dos subunidades c-fos y c-jun, cuya expresión es inducida de modo independiente por la unión de diferentes factores de transcripción a diversas secuencias específicas, a través de la activación de proteínas quinasas. Una vez formado el complejo c-fos/c-jun (AP-1), se unirá a determinados genes (a sus secuencias TRE) con el fin de activar la transcripción.

El factor AP-1 interactúa con secuencias TRE para inducir la expresión de determinados genes. Se ha observado que induce la expresión de genes codificantes para proteínas involucradas en el daño renal [148]. La estimulación de este factor requiere de la previa activación de proteínas intracelulares como las MAP-quinasas [151] (figura I). En procesos de hipertrofia cardiovascular y remodelamiento se ha demostrado una activación de MAP-quinasas, seguida de la estimulación del complejo AP-1 [148,152]. Este factor regula directamente diversas funciones biológicas como proliferación, producción de matriz extracelular, apoptosis y supervivencia celular [148]. Algunos autores han observado en diferentes tipos celulares que AP-1 media respuestas inflamatorias inducidas por diversas citoquinas, oncogenes, agentes oxidantes y factores de crecimiento [152,153].

OBJETIVOS

OBJETIVOS

General

El objetivo principal de esta Tesis es estudiar el papel del sistema Renina-Angiotensina (SRA) en la patogenia del daño tisular, evaluando si el péptido efector, la Angiotensina II, actúa como un mediador en este proceso. Para ello estudiamos, *in vivo* e *in vitro*, el efecto de la Angiotensina II a nivel renal y vascular, analizando receptores, mecanismos intracelulares, factores de transcripción, y expresión de genes/proteínas, involucrados en estos procesos. Asimismo, determinamos la posible participación de otros péptidos de este sistema en los procesos de daño renal, comparándolas con las respuestas conocidas de la Angiotensina II.

Concretos

Estudios *In vivo*:

- Evaluar el efecto de la infusión sistémica de Angiotensina II en riñón y aorta en ratas normotensas, analizando:
 - el daño morfológico y las células implicadas,
 - la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1,
 - los receptores de Angiotensina II involucrados y
 - la participación de diversos mediadores (TNF- α , CTGF, PTHrP) implicados en el daño tisular.

Estudios *In vitro*:

- Determinar en células en cultivo (renales, vasculares y circulantes) si la Angiotensina II, y otros productos de degradación del SRA, AngIII, AngIV y Ang(1-7), son capaces de regular la actividad de NF- κ B y AP-1.
- Analizar el tipo de receptor de Angiotensina II y los mecanismos implicados en la activación de estos factores de transcripción.
- Evaluar los niveles de expresión de proteínas involucradas en el daño tisular inducido por Angiotensina II a través de la activación de NF- κ B, diferenciando el receptor utilizado en cada caso.
- Estudiar finalmente la posible participación del producto de degradación de Angiotensina II, la Angiotensina III, en la proliferación celular, inflamación y fibrosis, analizando la activación de NF- κ B y la producción de mediadores importantes en estos eventos, así como el receptor utilizado a nivel renal.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1 Cultivo de células mesangiales glomerulares renales:

El cultivo de células mesangiales (CM) de rata o ratón se realiza según una técnica previamente descrita [154]. Brevemente, se escogieron ratas macho Sprague-Dawley con un peso de 150-180 g, o ratones macho de 20 g (cepa C57BL6, fenotipo salvaje o deficientes del receptor AT_1 , donados por Dr. Sugaya, Osaka, Japón) y se les extrajeron los riñones. Posteriormente se descapsularon y se separaron las cortezas renales de donde aislamos sus glomérulos mediante el paso por distintos tamices y posterior digestión con colagenasa tipo IA (50 U/ml; Sigma Chem., St. Louis, MO, EEUU). Finalmente se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, EEUU), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF), 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2 mmol/L glutamina, cultivándose en estufa a 37° C y con atmósfera al 5% de CO_2 . Al llegar casi a la confluencia, las células fueron depleccionadas durante 48 horas en medio RPMI al 0.5% de STF, para iniciar los experimentos. Las CM se caracterizaron por microscopía de contraste de fase, tinción positiva para desmina y vimentina, y tinción negativa para el antígeno relacionado con el factor VIII y citoqueratina, excluyendo contaminación endotelial y epitelial, respectivamente [155] (datos no mostrados).

1.2 Cultivo de células vasculares de músculo liso de aorta:

Se escogieron ratas macho Sprague-Dawley de 150-180 g o ratones (cepa C57BL6) macho de 20 g, a los cuales se anestesiaron y extrajeron las aortas a nivel torácico. Estos vasos se lavaron a continuación con PBS frío para eliminar los restos de células sanguíneas, se trocearon e incubaron en flashes durante 45 min a 37° en medio DMEN (Dulbecco Modified Eagle's Medium) sin STF, y con colagenasa tipo II (80 U/mL; Sigma Chem., St. Louis, MO, EEUU). Tras la digestión, se detuvo la reacción con DMEN al 10% de STF, y se cultivaron las aortas en flashes, previo lavado con medio nuevo. Allí permanecieron una semana hasta llegar a obtener las células vasculares de músculo liso. Después de varias tripsinizaciones, las células se depleccionaron y se utilizaron para los experimentos (entre pase 2 y 5). Las células vasculares de músculo liso se caracterizaron por microscopía de contraste de fase, y mediante tinción positiva para α -actina, y negativa para el factor VIII, con el fin de excluir la posible contaminación endotelial [70].

1.3 Cultivo de células tubulares renales:

La línea celular de células tubulares epiteliales de ratón MCTs fueron donadas por el Dr. E. Nielson (Universidad de Pensilvania). Las células crecieron en placas con

medio RPMI al 10% de STF. Al llegar casi a la confluencia, las células se depleccionaron durante 48 horas con medio RPMI sin STF y se realizaron los diferentes estudios.

1.4 Cultivo de células mononucleares humanas:

Las líneas celulares de monocitos U937 o THP-1 humanos fueron obtenidas del American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC: CRL1570 y CCTIB202, respectivamente). Las células crecieron en suspensión en flashes con medio RPMI al 10% de STF. Previamente al experimento, las células fueron depleccionadas durante 48 horas con medio RPMI sin STF.

2. Modelo experimental de infusión sistémica de Angiotensina II (AngII).

El estudio del efecto directo de la AngII *in vivo* se realizó mediante la infusión subcutánea de AngII en ratas Sprague-Dawley normotensas (150-180 g). Para ello se implantaron bajo la piel minibombas osmóticas (Alza Corp., mod 2001) rellenas de AngII (disuelta en salino). La AngII es liberada con una velocidad y concentración constante de 50 ng/kg/min. Esta dosis es similar a otras previamente probadas en rata, donde se producía fibrosis renal y aumento de presión, aunque dentro del rango normotenso [46,47,156,163]. Los animales se sacrificaron al cabo de 24, 48 o 72 horas (estudio de la fase aguda), o de 7 días (estudio de la fase crónica).

Previamente se ha descrito que la infusión de AngII eleva la actividad simpática renal, la presión sanguínea y atenúa la excreción de sodio [158,159]. Además, estimula la proliferación de células renales, infiltrado inflamatorio, acúmulo de matriz extracelular [72,74,104] e inducción de factores de crecimiento [160,161], y promueve el crecimiento de los microvasos [162]. Sin embargo, los mecanismos intracelulares y los receptores implicados en estos procesos no han sido totalmente esclarecidos. Por ello, además algunos animales se trataron con el antagonista específico del receptor AT₁, Losartan (10 mg/kg/día, suministrado en el agua de bebida y reemplazado cada 24 horas) o con el antagonista del AT₂, PD123319 (30 mg/kg/min, infusión subcutánea mediante minibombas), desde 24h antes del tratamiento con AngII, hasta el final del estudio. Estas dosis de los antagonistas han demostrado previamente el bloqueo efectivo de ambos receptores [46,47,163].

Después de todos los tratamientos, los animales fueron anestesiados, y perfundidos con salino frío, para extraer sus riñones y aortas, y se guardaron en formol o nitrógeno líquido, según la posterior técnica de estudio.

La *presión arterial sistólica* fue medida en ratas conscientes con un esfigmomanómetro en la vena dorsal del rabo (NARCO Biosystems, Colorado). El valor de la presión sanguínea para cada rata fue calculado como la media de tres medidas separadas en cada sesión. Todos los animales fueron manipulados según la normativa de la CEE (BOE 223/1988 y 265/1990).

3. Modelo experimental de obstrucción unilateral (UUO)

Los ratones C57BL6 (de fenotipo salvaje y deficientes del receptor AT_1) de 10 semanas (~20-25 g) fueron anestesiados con pentobarbital y se procedió a ligar sus uréteres izquierdos con seda (4/0) en dos localizaciones. Posteriormente se realizó un corte entre las ligaduras para prevenir la posible infección del tracto urinario. Transcurridos los dos días de UUO, los ratones fueron sacrificados para obtener sus riñones (obstruido y contralateral) y analizar por EMSA la activación de NF- κ B. Como controles se utilizaron ratones normales de la misma cepa sin operación.

4. Modelo experimental de nefritis por inmunocomplejos

La glomerulonefritis proliferativa inducida por ovoalbúmina (OVA) en ratas Wistar normotensas se realizó según un protocolo previamente descrito [164]. Brevemente, en el día 0 se administraron 5 mg de OVA en adyuvante completo de Freud vía subcutánea. Tres semanas después se repitió la inyección utilizando adyuvante incompleto, y desde el día 28 hasta el sacrificio se inyectaron diariamente 10 mg/día de OVA vía intraperitoneal. Cuando la proteinuria alcanzó valores entre 20-50 mg/día los animales se distribuyeron al azar en dos grupos: tratados con quinapril (iECA) a la dosis de 100 mg/l (en el agua de bebida), y no tratados. Después de 3 semanas de seguimiento los animales se sacrificaron, perfundieron y se extrajeron sus riñones para posterior análisis.

5. Extracción del RNA celular y análisis por Northern blot

A partir de células en cultivo y transcurridos sus periodos de estimulación, el RNA celular fue extraído mediante el empleo de Trizol Reagent (Gibco Brl) y cuantificado por absorvancia a 260 nm. Posteriormente muestras de RNA de 10 a 40 μ g fueron desnaturalizadas y sometidas a separación electroforética en geles al 1% de agarosa-formaldehído. Estos se transfirieron capilarmente a membranas de nylon (Genescreen, New England Nuclear, Boston, MA, USA). Mediante tinción con bromuro de etidio, se comprobó en cada gel la carga equivalente de RNA, la ausencia de degradación, la posición de los RNA ribosomales 28S y 18S, así como la eficacia de la transferencia por capilaridad. Las membranas fueron prehibridadas durante al menos 4 h a 42°C en solución de hibridación (50% formamida, 1% SDS, 5x SSC, 5x solución de Denhardt, 0.25 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado y 50 mmol/L tampón fosfato sódico, pH=6.5). La hibridación se realizó a 42°C toda la noche con 20% sulfato de dextrano y la sonda de DNA marcada* (ver debajo) y desnaturalizada. Una vez finalizada la hibridación, se procedió al lavado del exceso de sonda de las membranas en 2x SSC, 0.1% SDS, durante 30 min a temperatura ambiente, y dos veces con 0.2x SSC, 0.1% SDS, a 55°C durante 15 min. La autoradiografía se realizó según técnicas

estándar y se utilizó al G3PDH como control de carga en los geles. La relación RNAm vs G3PDH fue expresada en incremento de n-veces el valor.

* *Marcaje de sondas de DNA*: Las sondas de DNA de MCP-1 de rata (fragmento de RT-PCR), de TGF- β 1 murino (fragmento de 279 pb producto de restricción con EcoR1) y c-fos (ATCCHf677) fueron marcadas radiactivamente por el método de "random primer" (Boehringer Mannheim, Germany) con α - 32 [P] dCTP.

6. Análisis por RT-PCR

En algunos casos, los niveles de mRNA celular se estudiaron por RT-PCR. Las reacciones de RT (retrotranscripción) y PCR (amplificación) se realizaron conjuntamente. Para los ensayos de RT-PCR se utilizaron 100 nmoles de RNA total. La secuencia de cada primer utilizado, el tamaño de los productos de RT-PCR resultantes y las condiciones de reacción, se detallan a continuación:

Gen	SECUENCIA PRIMERS	TAMAÑO (p.b.)	CICLOS	CONDICIONES
Angiotensinógeno	5'-CCAGCCGGGAGGTGCAGT-3' 5'-TTCAGGCCAAGACCTCCC-3'	308	30	1 min a 63°
GAPDH	5'-ATACTGTTACTTATACCGATG-3' 5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3'	515	25	1 min a 54°
Receptor AT ₂	5'-CTGACCCTGAACATGTTTGCA-3' 5'-GGTGTCCATTTCTCTAAGAG-3'	710	35	1 min a 58°
MCP-1	5'-AGAGAGCCAGACGGAGGAAG-3' 3'-GTCACACTGGTCACTCCTAC-5'	519	25	1 min a 60°

Figura I. Condiciones de reacción de la RT-PCR. El RNA celular fue extraído y amplificado con cDNA cuyos primers se muestran en la tabla. Además se muestra el tamaño del producto de RT-PCR (en pares de bases), la temperatura y los ciclos de amplificación de las reacciones para los determinados genes.

7. Determinación de la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Ensayo de EMSA) en células o tejido.

7.1 Extracción de proteínas nucleares y citosólicas:

Las células en estado de reposo fueron incubadas durante diferentes tiempos y después lavadas con salino, tripsinizadas y resuspendidas en tampón-A (10 mmol/L Hepes pH=7.8, 15 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L ditiotretitol, 1 mmol/L PMSF). Tras mantenerlas 10 min en hielo las células fueron centrifugadas, resuspendidas en 100 μ l de tampón A y homogeneizadas. Mediante centrifugación a 3.500g durante 5 min, se separó la fracción citosólica de la nuclear, que se almacenó a -80°C hasta su estudio. El precipitado conteniendo los núcleos, se

resuspendió en tampón-A. Se les añadió KCl 3 mol/L gota a gota hasta una molaridad final de 0.39 mol/L, se incubaron durante 45 minutos a 4°C y se centrifugaron a 12.000g durante 30 min. Los sobrenadantes, con los extractos nucleares, se dializaron en tampón-B toda la noche a 4°C (50 mmol/L Hepes pH=7.8, 50 mmol/L KCl, 10% glicerol, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT y 0.1mmol/L EDTA). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su estudio y la concentración de proteína fue determinada por el método de BCA (Pierce).

A partir de tejido (riñón), la extracción de proteínas nucleares se realizó de modo similar. Los tejidos fueron pulverizados e incubados 30 min con tampón de lisis de tejido (20 mmol/L Hepes pH=7.8, 0.35 mmol/L NaCl, 20% glicerol, 5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L ditioneitol, 0.5 mmol/L PMSF, 1 µg/mL pepstatina A, 1.2 µg/mL esperidina y 2 µg/mL aprotinina). Tras centrifugación se aislaron los sobrenadantes conteniendo los extractos proteicos renales, y se dializaron toda la noche a 4°C en tampón B. Posteriormente se determinó la concentración de proteína por el método de BCA (Pierce).

7.2 Ensayo de unión:

Los extractos nucleares o proteicos (6 a 20 µg) se equilibraron en tampón-B. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con 0.35 pmols del oligonucleótido (NF-κB o AP-1) marcado radiactivamente * (ver debajo), y en presencia de 50 µg/ml de poly (dI-dC). Como control de la técnica se realizaron ensayos de competición, en los cuales las muestras se incubaron previamente durante 10 min en presencia de un exceso (100 veces) de sonda fría (NF-κB o AP-1, no marcado), con un NF-κB mutante o con un oligonucleótido inespecífico (AP-1 o NF-κB, respectivamente). Posteriormente, se añadió la sonda marcada, continuándose el experimento en las mismas condiciones. Como control positivo del experimento se utilizaron conocidos inductores de la activación del factor NF-κB o AP-1, como la citoquina IL-1 o el éster de forbol PMA. Como control negativo, se realizaron ensayos sin extracto nuclear.

La reacción se paró en todos los casos añadiendo tampón de carga (250 mmol/L Tris-HCl, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% xileno cianol y 20% glicerol). Mediante ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA), los complejos proteína-DNA fueron separados del exceso de sonda no unida en un gel no desnaturante de poliacrilamida al 4%, en 0.25% TBE (Tris-HCl- Ac. Bórico- EDTA) a 150 V y durante 1 h a temperatura ambiente.

Para los ensayos de *superretardo* de NF-κB se añadió 1µg de anticuerpo frente a sus subunidades (p50, p65 o c-Rel), antes de la incorporación del NF-κB marcado y durante una hora a temperatura ambiente. En todos los casos, una vez terminada la electroforesis, los geles fueron secados y expuestos para autorradiografía.

* *Marcaje del oligonucleótido consenso*: El oligonucleótido consenso del factor NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') o AP-1 (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') se marcó con [γ - 32 P]ATP mediante incubación a 37°C y durante 10 min, con 10 U de T₄ polinucleótido quinasa (Promega-Madison, WI), en cuya reacción se añadieron 10 μ Ci de [γ - 32 P]ATP, 70 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂ y 5 mmol/L DTT. Finalmente la reacción se detuvo con EDTA hasta una concentración final de 0.05 mol/L y se llevó hasta un volumen final de 100 μ l con tampón TE (Tris-HCl- EDTA).

8. Ensayo de Southwestern *in situ* (NF- κ B y AP-1).

La detección de factores de transcripción en tejido se realizó mediante la técnica de Southwestern *in situ*; método no radioactivo que permite determinar la distribución y actividad de unión al DNA de factores de transcripción en el propio tejido [165]. Brevemente, secciones de tejido renal o de aorta previamente deshidratadas y rehidratadas, fueron fijadas con 0.5% paraformaldehído (PFA), y tratadas con levamisol 5 mmol/L (30 min). Después se digirieron con pepsina 0.5% en HCl 1N (30 min) y 0.1 mg/ml DNasa I (20 min), y se incubaron con el oligonucleótido (100 pmol/L) del factor a estudiar, marcado con digoxigenina. Finalmente, se revelaron mediante un método colorimétrico usando un anticuerpo frente a digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. La reacción se detuvo con 1 mmol/L EDTA. Las muestras fueron montadas en glicerol y analizadas por microscopía óptica. Los oligonucleótidos consenso empleados fueron:

NF- κ B: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', y

AP-1: 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'); y los oligonucleótidos mutantes:

NF- κ B: 5'-AGTTGAGGCTCCTTTCCCAGGC-3', y

AP-1: 5'-CGCTTGATAAAATCAGCCGGAA-3').

9. Ensayo de Western Blot

Los fragmentos citosólicos y nucleares se obtuvieron como se describe en el apartado 7.1 y se separaron electroforéticamente en un gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se transfirieron a membranas de PVDF y se bloquearon mediante incubación a 37°C, 30 min y con leche descremada en polvo al 5% en tampón Tris-HCl (0.01 mmol/L, NaCl 0.1 mmol/L y Tween-20 al 0.1%; pH 7.5). Transcurrido el tiempo de bloqueo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 18 horas a 4°C. Después se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, durante una hora a 37°C. Finalmente las membranas se lavaron nuevamente y se revelaron empleando un kit de ECL quimioluminiscente (Amersham).

10. Ensayo de Inmunohistoquímica

10.1 Inmunohistoquímica de células:

Para estudiar la producción de la quimioquina MCP-1 o las subunidades de NF- κ B; p50 y p65 se utilizaron células, crecidas en placas de 8 pocillos Titer-Tek (Costar, Cambridge, MD). Las células, en estado de reposo, fueron tratadas con los diferentes estímulos. Después se lavaron en PBS y se fijaron en metanol/acetona durante 30 min a -20°C . Se mantuvieron en hielo durante 10 min y se trataron con PFA al 3% (1 min) y con Tritón X-100 al 0.05% (10 min), para permeabilizar las membranas celulares. Las células se bloquearon con suero en 1% BSA/PBS durante 30 min a 37°C . Después se incubaron con el anticuerpo primario policlonal durante toda la noche y a 4°C , y tras lavarlas en 0.2% BSA/PBS, se añadió el anticuerpo secundario (1 h a temperatura ambiente) marcado con FITC (The binding site, Birmingham, UK). Los controles negativos fueron obtenidos incubando las células sin el anticuerpo primario. Finalmente se lavaron las células en 0.2% BSA/PBS y se montaron en solución glicerol-PBS al 70% para examinarlas con microscopio de fluorescencia, y fotografiarlas con exposiciones equivalentes. Para el estudio de los receptores AT₁ y AT₂, el proceso fue similar pero en este caso las células no se pretrataron con Tritón X-100, y la localización de los receptores se realizó con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa.

10.2 Inmunohistoquímica de tejido:

En el caso de tejido, tras la extracción en formol-etanol de los riñones o aortas de rata, se incluyeron en parafina para ser cortados (a $4\text{ }\mu\text{m}$) y preparados para los estudios inmunohistoquímicos. Posteriormente, los tejidos cortados fueron desparafinados, hidratados, y bloqueadas las posibles uniones inespecíficas mediante BSA y suero (1 h a temperatura ambiente). Después se incubaron a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario y seguidamente con el secundario marcado con biotina (1 h a temperatura ambiente). Finalmente después de lavarse, se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako) 0.05% en H_2O_2 0.3% durante 10 min, se montaron en DPX y se analizaron por microscopía óptica.

11. Análisis microscópico.

Las muestras de tejidos renales y de aorta se estudiaron por tinción con hematoxilina/eosina y tricrómico de Masson, para ser examinadas por microscopía óptica por dos patólogos cualificados, sin conocimiento del grupo al que pertenecían los animales (Dra. J. Blanco y Dr. L. Ortega, del Hospital Clínico de Madrid).

12. Anticuerpos utilizados:

ANTICUERPO (anti rata)	FUENTE	CASA COMERCIAL
Anti-p50	Conejo	Sta. Cruz
Anti-p65	Conejo	Sta. Cruz
Anti-TNF- α	Cabra	R.D.
Anti-PTHrP	Conejo	(donado por Dr. Esbrit)
Anti-CTGF	Humano	R.D.
Anti-AT ₁	Conejo	Sta. Cruz
Anti-AT ₂	Conejo	Sta. Cruz
Anti-MCP-1	Cabra	Peprotech EC
Anti-I κ B α	Conejo	Sta. Cruz
Anti-I κ B β	Conejo	Sta. Cruz

13. Estudio del infiltrado inflamatorio

El infiltrado inflamatorio se analizó en riñón por inmunohistoquímica con un anticuerpos frente a los antígenos CD43 y ED1 de rata (Pharmingen). El primer anticuerpo reconoce el epítipo CD43 expresado en monocitos, macrófagos y células T, y el segundo, es específico de monocitos/macrófagos.

14. Ensayo de Quimiotaxis

Las células mesangiales quiescentes fueron incubadas durante 18 h con los diferentes estímulos. La actividad quimioattractante de los sobrenadantes de estas células se estudió en placas de 24 pocillos (Transwell, Costar) con membranas de 5 μ m de tamaño de poro, como previamente se había descrito [166]. Estudios previos han examinado la migración causada por quimioquinas en líneas celulares monocíticas; THPs, Mono-Mac6 y U937, pero sólo las THPs y las Mono-Mac6 respondieron a las beta-quimioquinas (como MCP-1), mientras que las U937 no respondieron a ninguna de las quimioquinas de esta familia [167]. Por este motivo elegimos a las THPs para evaluar la producción por células mesangiales de factores quimiotácticos, en particular, el MCP-1. En los pocillos sobre las membranas, se cargaron 2.5×10^5 monocitos (THPs), y en la parte inferior, 500 μ l de sobrenadante celular, medio de cultivo sólo (RPMI; control negativo), o MCP-1 recombinante de rata (100 ng/ml) disuelto en RPMI (control positivo). Las placas fueron incubadas 1h a 37°C para permitir la transmigración. Los monocitos migradores se contaron en la parte inferior de los pocillos mediante citometría de flujo. La quimiotaxis específica representa la media de las células migradoras menos la media de las células migradoras en el medio de cultivo sólo, y en relación con las células que quedan en la parte superior de los pocillos. La relación quimiocinesis-quimiotaxis fue

realizada para determinar la migración aleatoria, como previamente se había descrito [168]. Los experimentos de neutralización se realizaron con un anticuerpo frente a MCP-1 de rata (1 μ g/ml) a 37°C durante 1h. Estos resultados están expresados como incremento n-veces frente a células no estimuladas y como % de inhibición frente a sobrenadantes sin anticuerpo. Además medimos la quimiotaxis directa provocada por los péptidos de Angiotensina. Para ello, los estímulos (AngIII, AngII y además el MCP-1) fueron resuspendidos en medio de cultivo sin suero en la parte inferior de los pocillos, e incubados durante 1, 2 o 4 h. Los resultados están expresados como número de células migrantes por estímulo, y como control se tomó el medio de cultivo sólo.

15. Cuantificación de la síntesis de fibronectina. Ensayo de Inmunoprecipitación

La síntesis *de novo* de fibronectina en respuesta a diferentes estímulos, se determinó mediante marcaje metabólico con [³⁵S]-Metionina y posterior inmunoprecipitación con anticuerpo anti-fibronectina [169]. Las células en estado de reposo, cultivadas en placas de 24 pocillos, se marcaron metabólicamente con 20 μ Ci/ml de [³⁵S]-Metionina en un medio deficiente de metionina, en presencia de los diferentes estímulos. Transcurridos los tiempos de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se solubilizaron las células con tampón de extracción (50nmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Trión X-100, 2 mmol/L PMSF, 2 mmol/L EDTA y 5 mmol/L NEM, pH=7.4). Las muestras fueron inmunoprecipitadas con exceso de anticuerpo anti-fibronectina (50 μ g) a 4°C durante 12-14 h. A continuación, los inmunocomplejos formados se recuperaron mediante incubación durante 2 h con bolitas de proteína A-sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las bolitas fueron lavadas con tampón de extracción para eliminar la radioactividad libre y las proteínas no unidas específicamente, realizándose un último lavado en ausencia de detergente. La fibronectina se liberó de los complejos calentándola a 100°C durante 5 min en tampón de electroforesis y se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, con un gel de desarrollo al 7.5% y un gel concentrante al 3%. Los geles fueron tratados con técnicas para fluorografía y expuestos para autorradiografía. Como control negativo del experimento de inmunoprecipitación, se empleó una IgG normal de conejo (50 μ g/ml), y como control positivo de la síntesis de fibronectina se utilizó TGF- β 1 humano (50 μ mol/L).

16. Transfecciones transitorias y ensayo de luciferasa

En células vasculares en reposo se realizaron dobles transfecciones transitorias con NF- κ B/luc y TK-renila (Stratagene) mediante el método balístico (Biolistic PDS-1000/He System (BIO-RAD Laboratories, CA, USA)) [58]. La presión de helio (2200

p.s.i.) y el circuito de vacío en el sistema acelera los microtransportadores conteniendo las partículas de oro (AU-165 de 0.8-1.6 μm ; ABCR) recubiertas de DNA (1 mg oro recubierto de 1 μg del plásmido de NF- κ B/luc y 1 μg renila). Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio sin suero 24 h antes de ser estimuladas. En los lisados celulares se analizaron las actividades luciferasa y renila (Promega).

17. Farmacología

Para el estudio de los receptores de Angiotensina se utilizaron antagonistas no peptídicos específicos; el antagonista frente al AT₁, denominado Losartan (DUP753, donado por MSD, España) y antagonistas frente al AT₂, denominados PD123319 (Sigma, España), y GCP412 (Sigma), el cual posee además propiedades agonistas [35]. Además se utilizó un agonista del receptor AT₂, el para-aminofenilalanina (pNH₂FAII) [33].

Para el estudio de los mecanismos intracelulares se utilizaron diferentes compuestos:

- inhibidores de la proteína quinasa C (PKC); bisdolitmaleimida (BIP) y H7
- inhibidores de las proteínas quinasas (PTK); genisteína, erbstatina y herbimicina A
- antioxidantes; catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y pirrolidin-ditiocarbamato (PDTTC)
- inhibidor del complejo del proteosoma; MG 123
- inhibidor de la síntesis de ceramidas; fumonisina B1 (FB₁)
- inhibidor de la proteína fosfatasa 2A (PP2A); ácido okadaico

Todos los inhibidores utilizados fueron adquiridos de Sigma, y para ninguno de ellos se observó citotoxicidad en nuestras condiciones de cultivo.

18. Análisis estadístico y valoración de los resultados

Las películas de autoradiografía fueron escaneadas usando el densitómetro Image Quant (Molecular Dynamics, CA, USA). Los datos se expresan en unidades arbitrarias de densitometrado como incremento respecto al control (n-veces) de media \pm error estándar de la media (EEM) o como resultado representativo de varios experimentos. El análisis de significación se realizó empleando el programa GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, EEUU). Las poblaciones se compararon utilizando el test de Wilcoxon y el de Student-Newman-Keuls, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$. Para los estudios de histopatología y Southwestern *in situ*, alrededor de 15 glomérulos, campos del intersticio o secciones de aorta de cada animal fueron examinados por un observador sin conocimiento previo del grupo al que pertenecían los animales analizados. Se asignó un valor arbitrario de 0 a 3 según la intensidad de la tinción siendo: 0, negativo; 1, tinción suave; 2, tinción moderada y 3, tinción fuerte.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. ESTUDIOS *IN VIVO*

En situaciones de daño tisular se ha descrito previamente un aumento de todos los componentes del sistema SRA. Por este motivo, el principal objetivo de esta Tesis fue conocer la influencia del péptido efector de este sistema, la AngII, a nivel renal y vascular:

1. Efecto de la infusión de AngII a nivel renal

Inicialmente estudiamos el efecto de la infusión sistémica de AngII (50 ng/kg/min mediante bomba subcutánea) en ratas normotensas Sprague Dawle, durante 24, 48 y 72 horas (fase aguda), y 7 días (fase crónica). Pasados los periodos de los tratamientos se procedió a la extracción de los riñones y se examinaron por diferentes técnicas (ver métodos).

Las lesiones morfológicas fueron analizadas por microscopía óptica en secciones renales incluidas en parafina. La infusión de AngII durante 24 y 48 h no indujo alteraciones estructurales significativas en el riñón. Sin embargo, tras 72h, se observó la presencia de células inflamatorias, a nivel glomerular e intersticial, y algunas lesiones tubulares (atrofia tubular), mientras que la mayor parte de los glomérulos aparecieron normales (figura 1). Además, la infusión de AngII en estas ratas aumentó la presión sanguínea a las 72 horas del seguimiento (121 ± 9 vs 100 ± 2 controles, $n=10$, $p<0.05$), aunque dentro del rango normotenso.

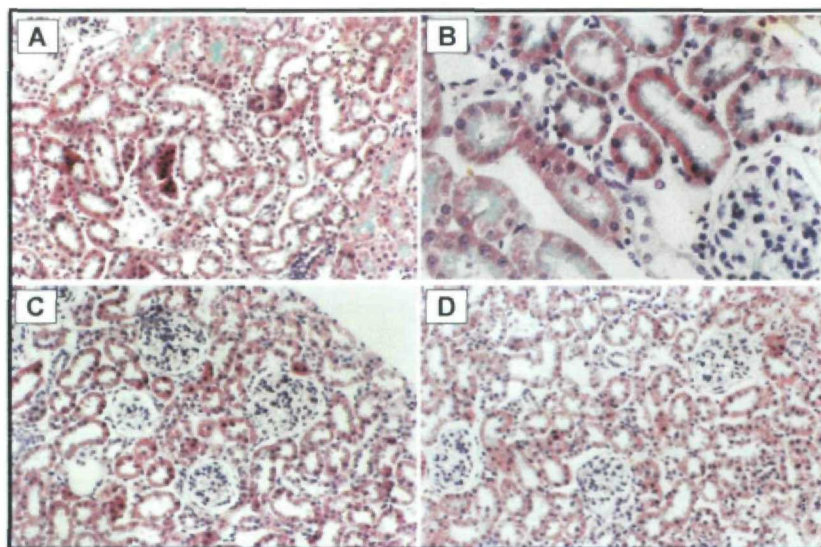


FIGURA 1. Lesiones morfológicas tras la infusión sistémica de AngII. Las fotografías muestran secciones renales de ratas infundidas con AngII (50 ng/kg/min) durante 72h (A,B). Otros animales fueron tratados con antagonistas de los receptores de AngII, Losartan (AT_1 , 10 mg/kg/día) (C), y PD123319 (AT_2 , 30 mg/kg/min) (D), y posteriormente infundidos con AngII. En la figura se muestran fotografías de la técnica de Masson correspondiente a las secciones renales de los diferentes animales. Magnificación $\times 100$, excepto en la B ($200\times$).

Después de 7 días de infusión de AngII, las lesiones fueron mayores, observándose aplanamiento de las células tubulares y dilatación tubular (datos no mostrados), similar a lo descrito previamente [172].

Para confirmar la presencia de células inflamatorias en el riñón, caracterizamos el infiltrado inflamatorio por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CD43 (figura 2 y 3). Estos anticuerpos monoclonales reconocen un epítipo de CD43 expresados en monocitos, macrófagos, células “killer” y células T. En los animales controles, tan sólo se observaron unas pocas células con tinción positiva con el anticuerpo anti-CD43 (figura 2 A, C y 3 E). En los animales infundidos 72 horas con AngII se observaron células inflamatorias que expresan el antígeno CD43 en el glomérulo (figura 2B, 3 B e I). En el intersticio el aumento fue mayor, presentando áreas de inflamación focal (figura 2C, 3 F e I). Además se empleó un anticuerpo frente al ED-1, que reconoce específicamente monocitos/macrófagos, observándose el mismo patrón de distribución (datos no mostrados).

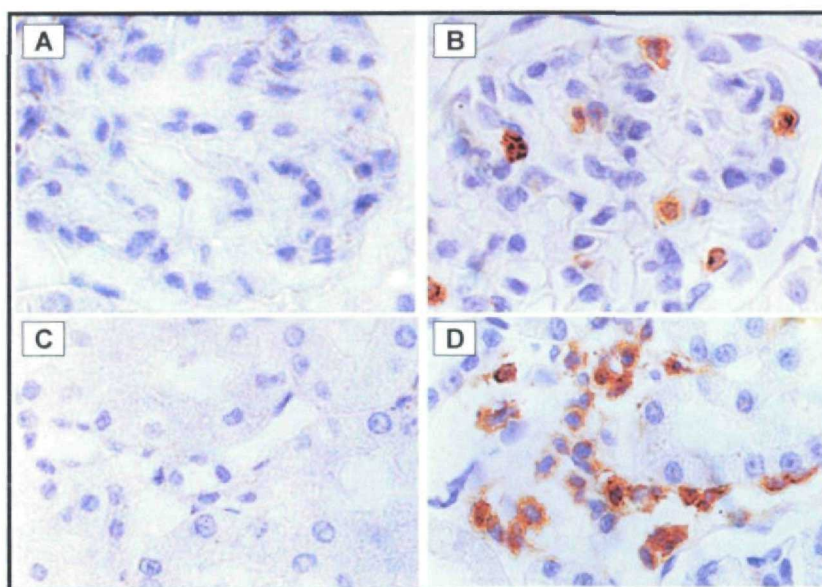


FIGURA 2. La infusión de AngII incrementa el infiltrado inflamatorio en el riñón. Las fotografías muestran áreas glomerulares (A, B) y tubulointersticiales (C, D) de un animal representativo de ratas control (A,C) e infundidas con AngII (72h) (B,D). Magnificación x1000. Las figuras muestran un animal representativo de cada grupo.

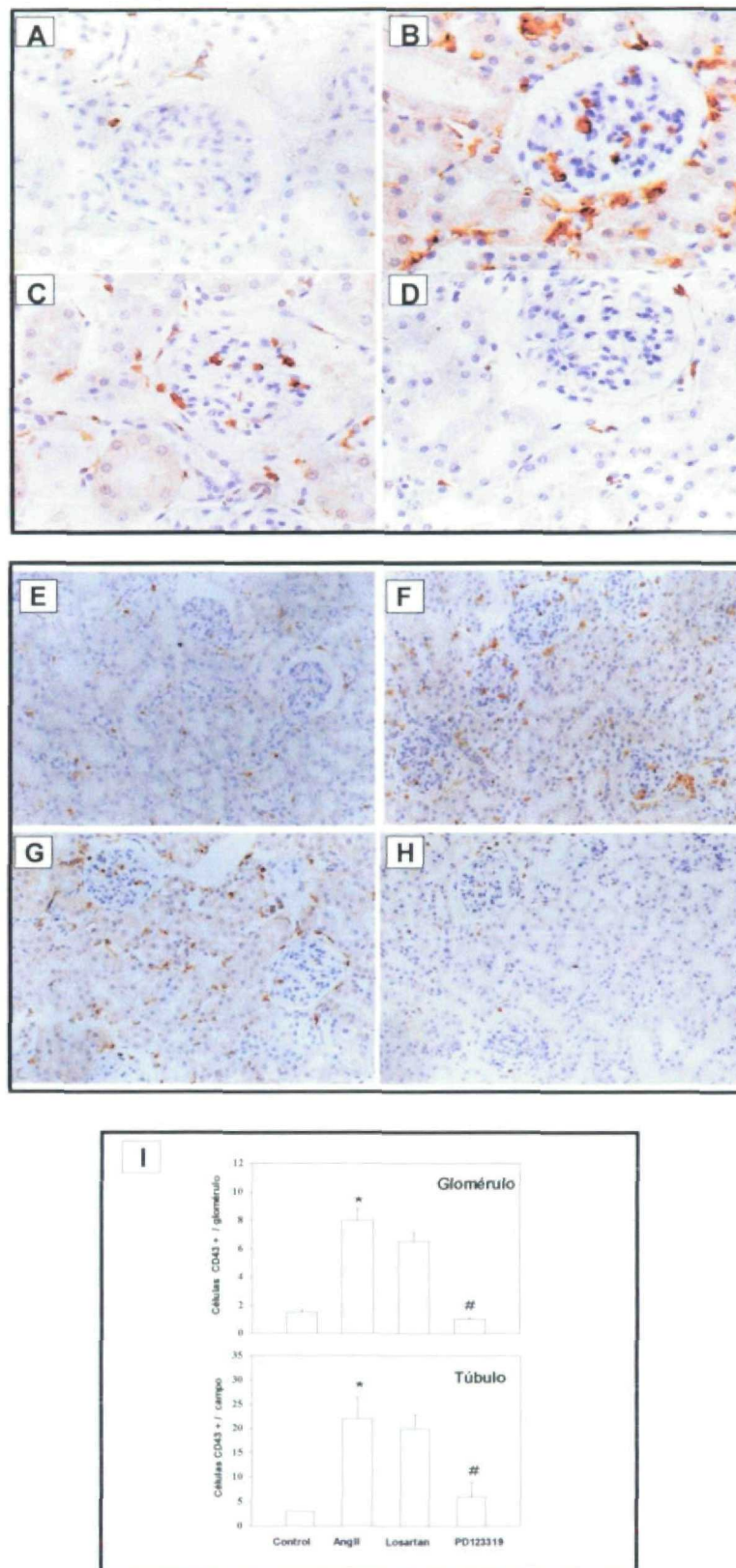


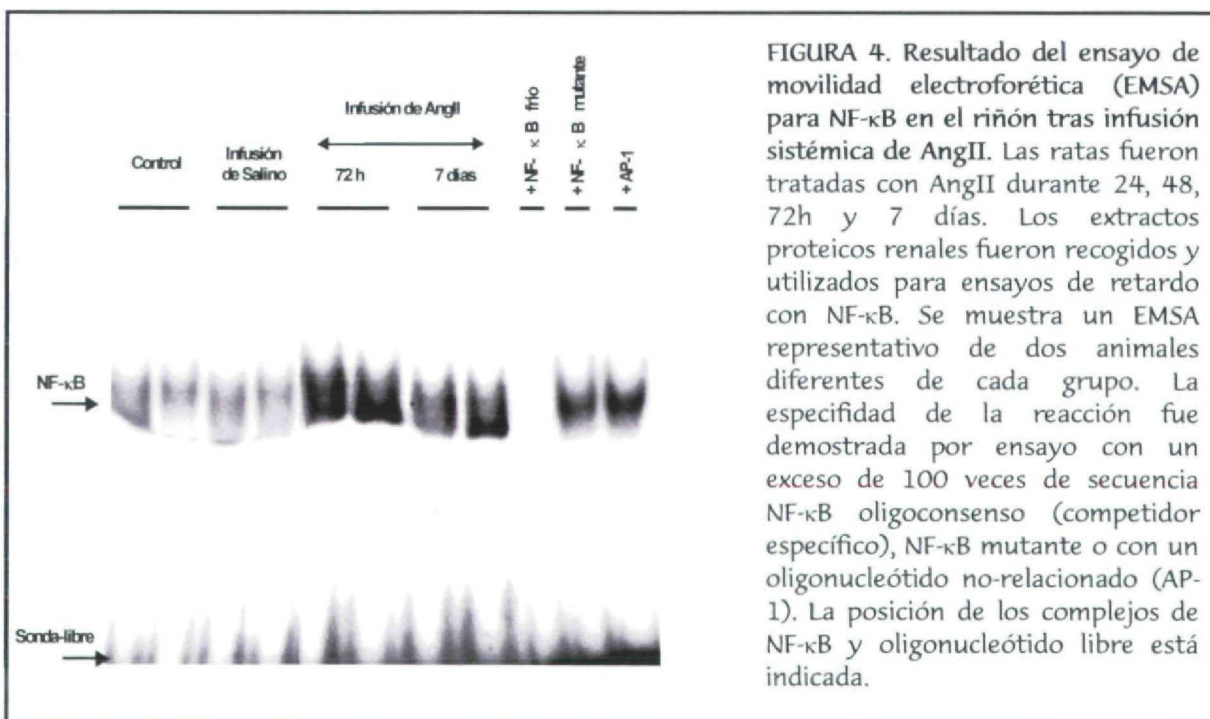
Figura 3. Papel de los antagonistas de los receptores de angiotensina en el infiltrado inflamatorio. Rata control (A,E), infundida con AngII durante 72h (B,F), y tratadas con el antagonista AT_1 , Losartan (C,G) o con el antagonista del AT_2 , PD123319 (D,H). Magnificación: x200 en E-H, x100 en I-L. (I). Quantificación de células CD43+ (células infiltrantes inflamatorias) en glomérulo y túbulo. Los resultados están expresados como media \pm EEM de células positivas por glomérulo o por campo de 6 a 10 animales por cada grupo. * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs AngII.

2. Papel de los receptores AT₁ y AT₂ en el daño renal inducido por AngII

Con el propósito de estudiar los receptores de angiotensina involucrados en estos procesos, empleamos dos antagonistas no peptídicos de los receptores AT₁ y AT₂ (Losartan y PD123319 respectivamente). Pretratamos las ratas 24 horas antes de la infusión de AngII con Losartan (en agua de bebida; 10 mg/kg/día) o con PD123319 (30 mg/kg/min; bomba subcutánea). Posterior y simultáneamente infundimos con AngII (50 ng/Kg/min) durante 72h. En estos animales, el pretratamiento con Losartan aminoró la atrofia tubular (figura 3 C, G), mientras que el PD123319 disminuyó el infiltrado inflamatorio, principalmente en las áreas glomerulares e intersticiales (figura 3 D, H, I). Además, el Losartan disminuyó hasta niveles basales la presión sanguínea (99 ± 2 , $n=6$, $p<0.05$ vs AngII) pero, por el contrario, el pretratamiento con PD123319 no modificó los valores de presión alcanzados por la infusión de AngII (123 ± 16 , $n=4$; $p=n.s.$ vs AngII; $p<0.05$ vs controles).

3. La infusión sistémica de AngII activa el factor nuclear NF- κ B en el riñón.

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos implicados en procesos de daño renal inducidos por AngII, evaluamos los niveles renales de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Se ha demostrado previamente que este factor está altamente implicado en procesos de daño tisular [5,70,174-176]. En nuestro estudio, después de la infusión de AngII aislamos los riñones y los congelamos en nitrógeno líquido (ver métodos). Posteriormente, los extractos proteicos de corteza renal fueron separados y analizados por EMSA con un oligoconsenso de NF- κ B marcado radioactivamente con γ -[³²P]-ATP.



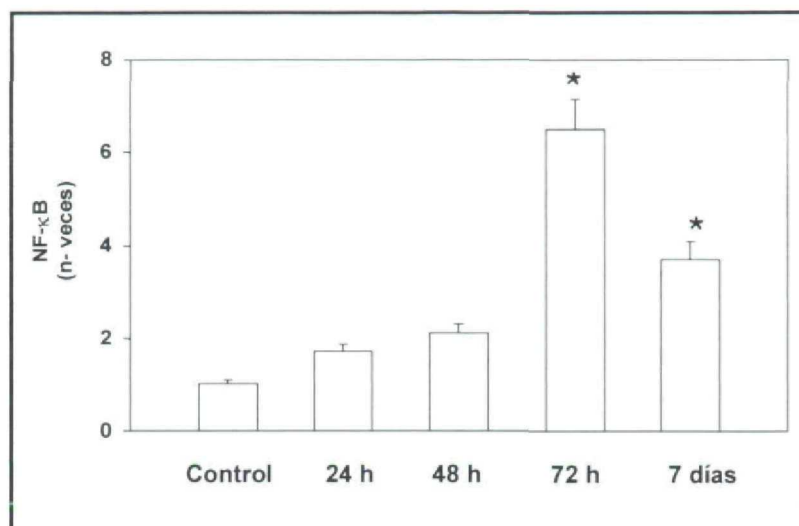


FIGURA 5. Valoración del ensayo de movilidad electroforética (EMSA) para NF-κB en el riñón, tras infusión sistémica de AngII. Los resultados están expresados como unidades arbitrarias de densitometrado de la media \pm EEM de 6 a 10 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ vs control.

En los animales infundidos con AngII durante 24h se observó un ligero aumento en la actividad renal del NF-κB, máximo a las 72h (6.5 veces de incremento vs control, $n=10$, $p < 0.05$), y disminuyó a los 7 días, aunque aún presentaba valores superiores a los animales sanos (3.7, $n=8$, $p < 0.05$, vs control) (figura 4 y 5). Como control se determinó la actividad renal del NF-κB en ratas infundidas con salino (solvente), no observándose diferencias con respecto a los animales sanos ($n=4$, $p=n.s.$, figura 4).

Con el objetivo de localizar concretamente las células renales implicadas en la activación del NF-κB en respuesta a AngII, realizamos ensayos de Southwestern *in situ*. Secciones renales de ratas control o infundidas con AngII (72h) se incubaron con el oligonucleótido NF-κB marcado con digoxigenina. Después se revelaron con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa (ver métodos). De este modo detectamos las células implicadas *in vivo* en la activación del NF-κB en respuesta a AngII.

Las secciones de tejido renal de animales sanos no presentaron tinción para NF-κB (figura 6 A, B y C). En los animales infundidos con AngII durante 72 h se detectó una gran cantidad de células con tinción nuclear positiva para el NF-κB. Los complejos activados de NF-κB estaban localizados en el glomérulo (células mesangiales, epiteliales y endoteliales, y células infiltrantes), (figura 6 D y E) y en áreas tubulointersticiales (algunas células epiteliales tubulares y células infiltrantes) (figura 6 F).

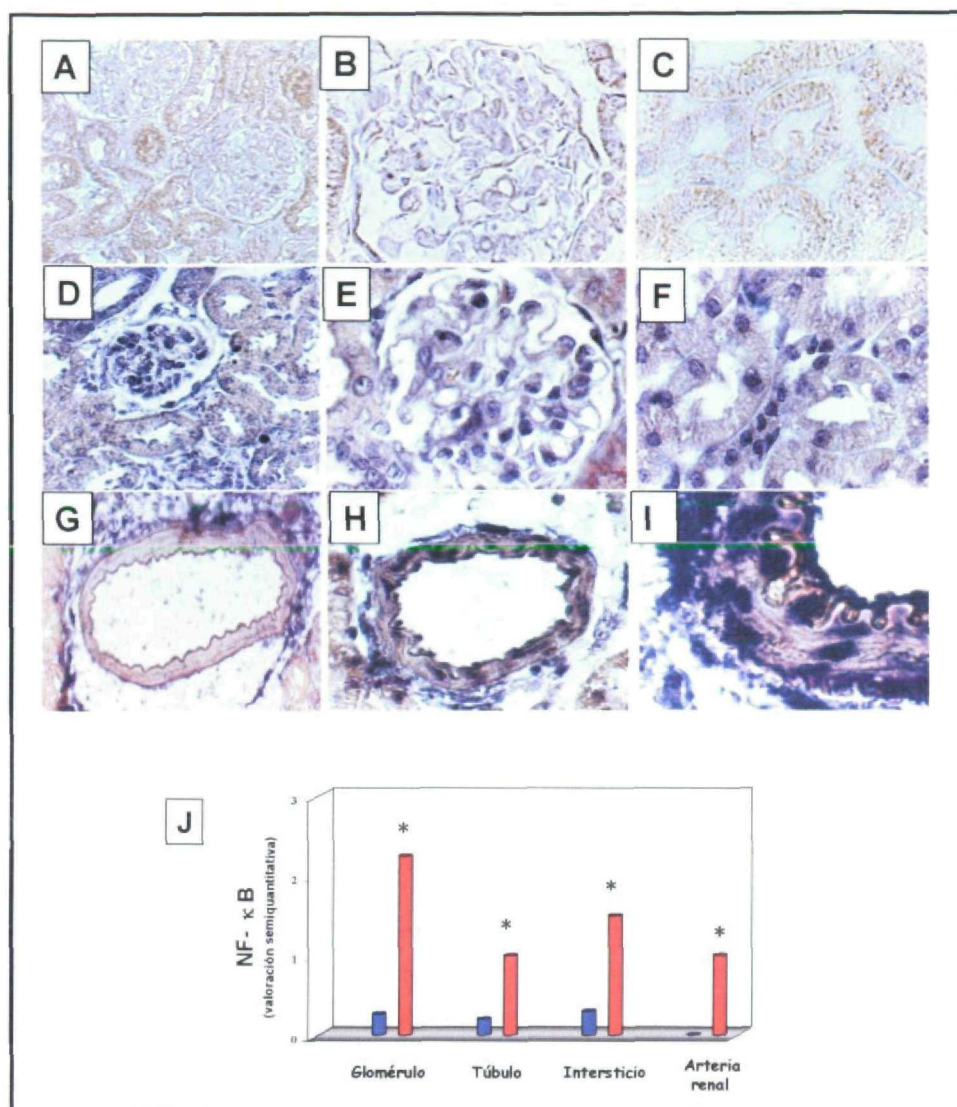


FIGURA 6. Técnica de Southwestern en ratas infundidas con AngII. Los animales control no presentaron tinción para NF- κ B (A,B,C). Tras la infusión de AngII durante 72h, se observó un claro marcaje nuclear para NF- κ B en algunas estructuras renales (D,E,F). En el glomérulo se observó una marcada tinción, concretamente en las células mesangiales, epiteliales y endoteliales (D,E). En el área tubulointersticial se detectó una intensa tinción para el NF- κ B, correspondiente a células infiltrantes y algunas tubuloepiteliales (F). Las arterias renales de ratas control no presentaron señal para NF- κ B (G), sin embargo, tras la infusión de AngII, aumentó la tinción nuclear localizada en células endoteliales y de músculo liso vascular (H,I). Aumento $\times 1000$ (excepto $\times 200$ en A,D, y $\times 2000$ en I). (j) Valoración semicuantitativa de la tinción para NF- κ B, siendo: (-), no marcaje; (1+), medio; (2+), moderado; (3+), intenso, siendo barras rojas para ratas infundidas con AngII, y azules para ratas control. La evaluación fue realizada por dos observadores independientes. Los resultados están expresados como media \pm EEM de 6-10 animales por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

Además, se observó un aumento de la tinción para el NF- κ B en las arterias renales, localizado en células endoteliales y de músculo liso vascular (figura 6 H e I). La cuantificación de la tinción del NF- κ B de los distintos grupos se muestra en la figura 6 J.

Como control de la técnica, secciones de tejido renal de animales infundidos con AngII se incubaron con un exceso del oligoconsenso de NF- κ B sin marcar o con un oligomutante de NF- κ B marcado con digoxigenina o en ausencia de sonda marcada con digoxigenina (figura 7). En estos experimentos no se detectó tinción para NF- κ B lo que demuestra la especificidad de la unión. Estos controles se realizaron en cada experimento.

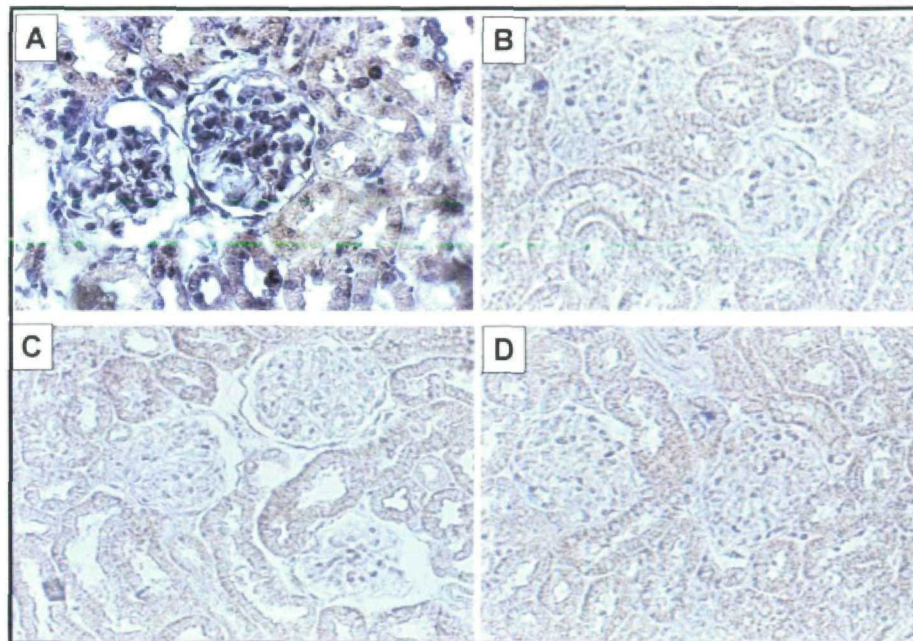


FIGURA 7. Controles de la técnica Southwestern. En secciones renales de ratas infundidas con AngII, se realizaron varios experimentos control. Los tejidos se trataron como se describe en Métodos, y se incubaron con NF- κ B marcado con digoxigenina sola (A) o en presencia de un exceso de 100 veces de oligonucleótido NF- κ B frío (experimento de competición) (B). Otros controles fueron realizados por incubación de muestras renales con un oligonucleótido NF- κ B mutante marcado con digoxigenina (C) o en ausencia de marcaje (D). Las figuras muestran un animal representativo de cada grupo. Magnificación $\times 200$.

4. Los antagonistas de los receptores AT₁ y AT₂ disminuyen la activación renal de NF- κ B.

Para determinar el receptor implicado en la activación de NF- κ B renal inducido por la infusión de AngII (72h), realizamos experimentos de EMSA en animales tratados con los antagonistas de los receptores AT₁ y AT₂ (Losartan y PD123319, respectivamente), como se describe en métodos. En la figura 8, podemos observar como ambos antagonistas disminuyen de forma parcial la actividad renal del NF- κ B inducida por AngII (Losartan: 44% inhibición vs infusión de AngII, $n=6$, $p<0.05$) y (PD123319: 53%, $n=4$, $p<0.05$). Los antagonistas solos, Losartan o PD123319, no afectan la actividad del NF- κ B (no mostrado).

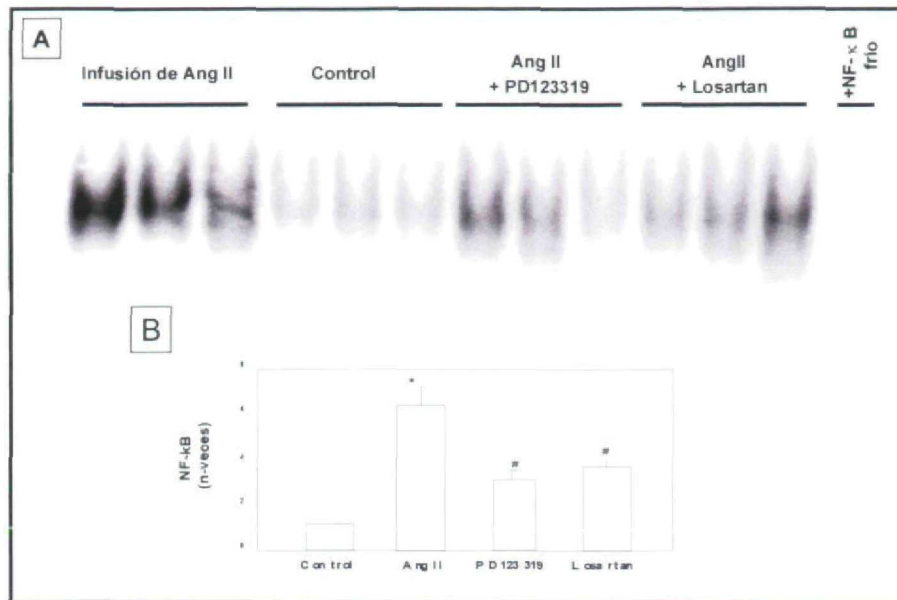


FIGURA 8. Papel de los receptores AT_1 y AT_2 en la activación de NF- κ B renal inducido por la infusión de AngII. Los animales fueron tratados durante 24h con los antagonistas de los receptores, AT_1 , Losartan, o AT_2 , PD123319, y posteriormente se infundieron con AngII durante 72h. (A). EMSA representativo de tres animales diferentes de cada grupo. La especificidad de la reacción se realizó con un exceso (100-veces) de oligonucleótido NF- κ B no marcado. (B) Análisis densitométrico de los resultados expresados como unidades arbitrarias de la media \pm EEM de 4 a 6 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs infusión de AngII.

Por otro lado, para localizar los tipos celulares en los que los antagonistas realizan su efecto inhibitorio en la activación de NF- κ B, realizamos ensayos de Southwestern *in situ*. Como podemos observar en la figura 9, ambos tratamientos disminuyen la tinción nuclear para NF- κ B en el glomérulo. El efecto del antagonista AT_1 (Losartan) se observó fundamentalmente en células epiteliales tubulares (9 C y G), mientras que el efecto del antagonista AT_2 (PD123319) fue principalmente en las células infiltrantes (9 D y H). La cuantificación de la tinción del NF- κ B se muestra en la figura 10.

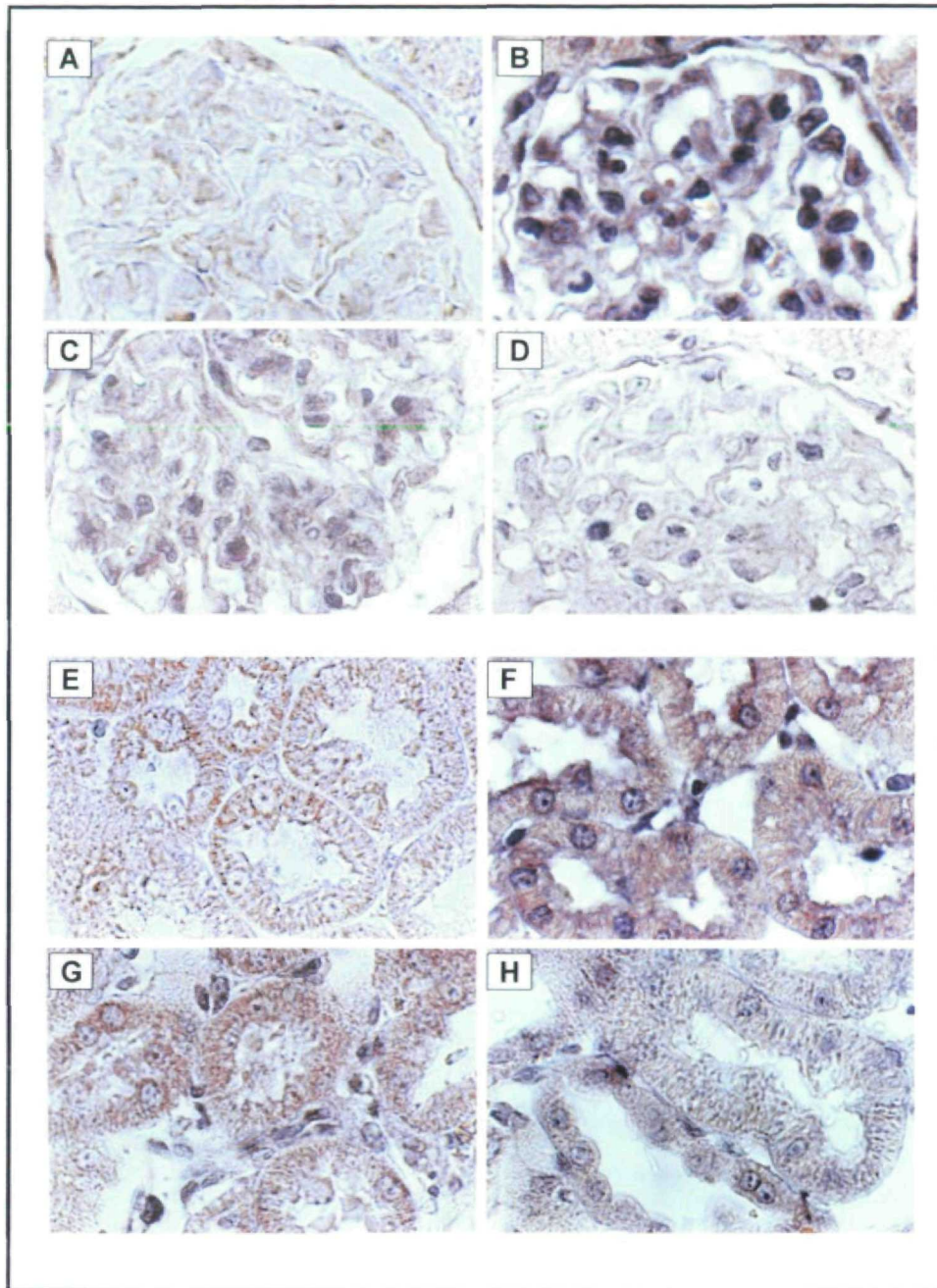


FIGURA 9. Efecto de los antagonistas de los receptores AT_1 y AT_2 en el NF- κ B en el área glomerular y tubulointersticial de ratas infundidas con AngII. Las fotografías muestran un animal representativo de cada grupo: control (A,E), infusión de AngII 72 h (B,F), pretratamiento con Losartan (C,G) o con PD123319 (D,H). Ambos tratamientos mostraron una disminución parcial de la tinción de NF- κ B en el glomérulo (C,D). El tratamiento con Losartan sólo disminuyó la tinción de NF- κ B en células tubulares (G), mientras que el bloqueo del receptor AT_2 disminuyó notablemente la tinción en células intersticiales infiltrantes (H).

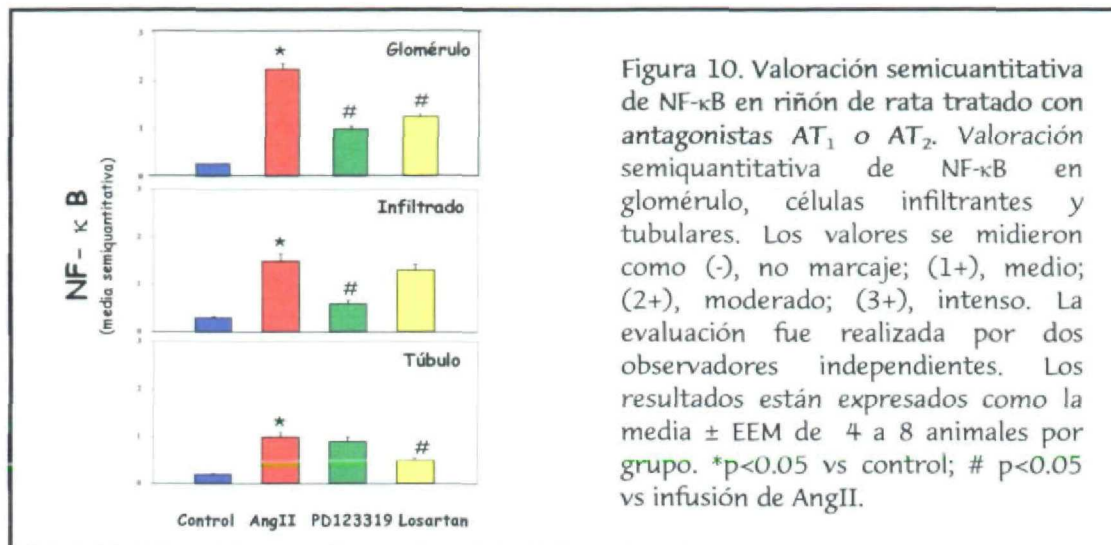


Figura 10. Valoración semicuantitativa de NF-κB en riñón de rata tratado con antagonistas AT₁ o AT₂. Valoración semicuantitativa de NF-κB en glomérulo, células infiltrantes y tubulares. Los valores se midieron como (-), no marcaje; (1+), medio; (2+), moderado; (3+), intenso. La evaluación fue realizada por dos observadores independientes. Los resultados están expresados como la media ± EEM de 4 a 8 animales por grupo. *p<0.05 vs control; # p<0.05 vs infusión de AngII.

En resumen, podemos concluir que la infusión sistémica de AngII afecta a nivel renal tanto en glomérulos como en túbulos y arteria renal, provocando un aumento de los niveles nucleares de NF-κB a través de los receptores AT₁ y AT₂.

4.1. Receptores implicados en la activación de NF-κB en situaciones de daño renal

Para profundizar en el papel de la ruta AngII/NF-κB y el tipo de receptor implicado en el daño renal, hemos estudiado el modelo de obstrucción unilateral ureteral (UUO), utilizando estrategias farmacológicas (bloqueo del SRA) y genéticas (uso de ratones AT₁(-/-)) (figura 11). En este modelo existe una activación del SRA renal, aumento de producción de AngII y actividad de NF-κB, y los fármacos que bloquean el SRA mejoran la evolución de la enfermedad (56,224,226,227). En ratones control, los riñones obstruidos presentaron aumento en la actividad de NF-κB (8.5-veces vs riñón contralateral; p<0.05, n=6), que fue disminuido por el antagonista AT₁ (alrededor 65% inhibición vs obstruido no tratado, p<0.05, n=4), lo que demuestra que el AT₁ está implicado en la activación de NF-κB en UUO. En ratones AT₁(-/-), la actividad de NF-κB estaba aumentada en el riñón obstruido comparado con el contralateral, pero el aumento fue algo menor que en los ratones control (7-veces vs riñón contralateral; p<0.05, n=6). También determinamos el papel del receptor AT₂. El antagonista AT₂ disminuyó la actividad NF-κB en los riñones obstruidos de ratones control y AT₁(-/-). Este efecto inhibitorio fue mayor en los AT₁(-/-) (alrededor de 90% inhibición vs obstruido no tratado, p<0.05, n=4) que en controles (60%; p<0.05, n=4). El iECA quinapril disminuyó la actividad renal de NF-κB en ambos genotipos (figura 11). Estos datos demuestran que en situaciones de daño renal, como en UUO, ambos receptores AT₁ y AT₂ están implicados en la activación de NF-κB.

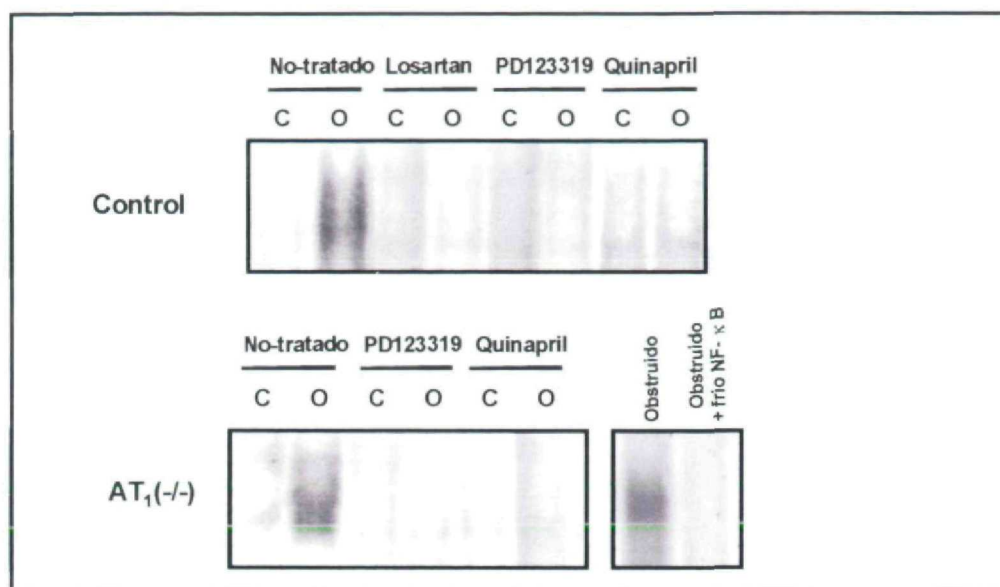


FIGURA 11. Análisis de la actividad renal de NF- κ B en ratones de fenotipo salvaje (Controles) y deficientes del receptor de AT₁ (AT₁(-/-)) sometidos a obstrucción unilateral del ureter (UUO). Los animales se trataron 1 día antes del UUO y se estudiaron 2 días después. La actividad renal de NF- κ B se determinó por EMSA. La especificidad se demostró por competición (exceso de 100-veces NF- κ B frío). La figura muestra un animal de cada grupo. C: riñón contralateral y O: obstruido. Efecto de los fármacos bloqueantes el SRA. Algunos animales se trataron con antagonistas de los receptores AT₁ (Losartan: 10 mg/Kg/día) y AT₂ PD123319 (30 mg/kg/día). El papel de la producción endógena de AngII se evaluó con el tratamiento con el iECA quinapril (30 mg/kg/día).

5. La infusión sistémica de AngII activa el factor nuclear AP-1 a través del AT₁ en el riñón.

Otro factor de transcripción que participa en procesos de daño tisular es el AP-1 (activator protein-1). El AP-1 es un factor nuclear que está asociado a la regulación de la matriz extracelular, y se ha observado que este proceso está mediado por el receptor AT₁ [148]. Con el objetivo de determinar si el receptor AT₂ pudiera estar implicado *in vivo* en la activación de otros factores nucleares por la AngII, estudiamos mediante EMSA la actividad del AP-1 en muestras de corteza renal. Extractos proteicos de cortezas renales fueron aislados y analizados por EMSA con un oligoconsenso de AP-1 marcado radioactivamente con γ -[³²P]-ATP.

En los animales infundidos con AngII se observó un aumento en la actividad renal del AP-1 después de 72h (2.6 veces de incremento vs control, n=8, p<0.05) y que decreció hasta niveles control pasados los 7 días (figura 12 A y B). Mediante técnicas de Southwestern observamos además que los animales infundidos con AngII durante 72h presentaban tinción nuclear positiva para AP-1 en el glomérulo y en áreas tubulointersticiales (figura 12 C).

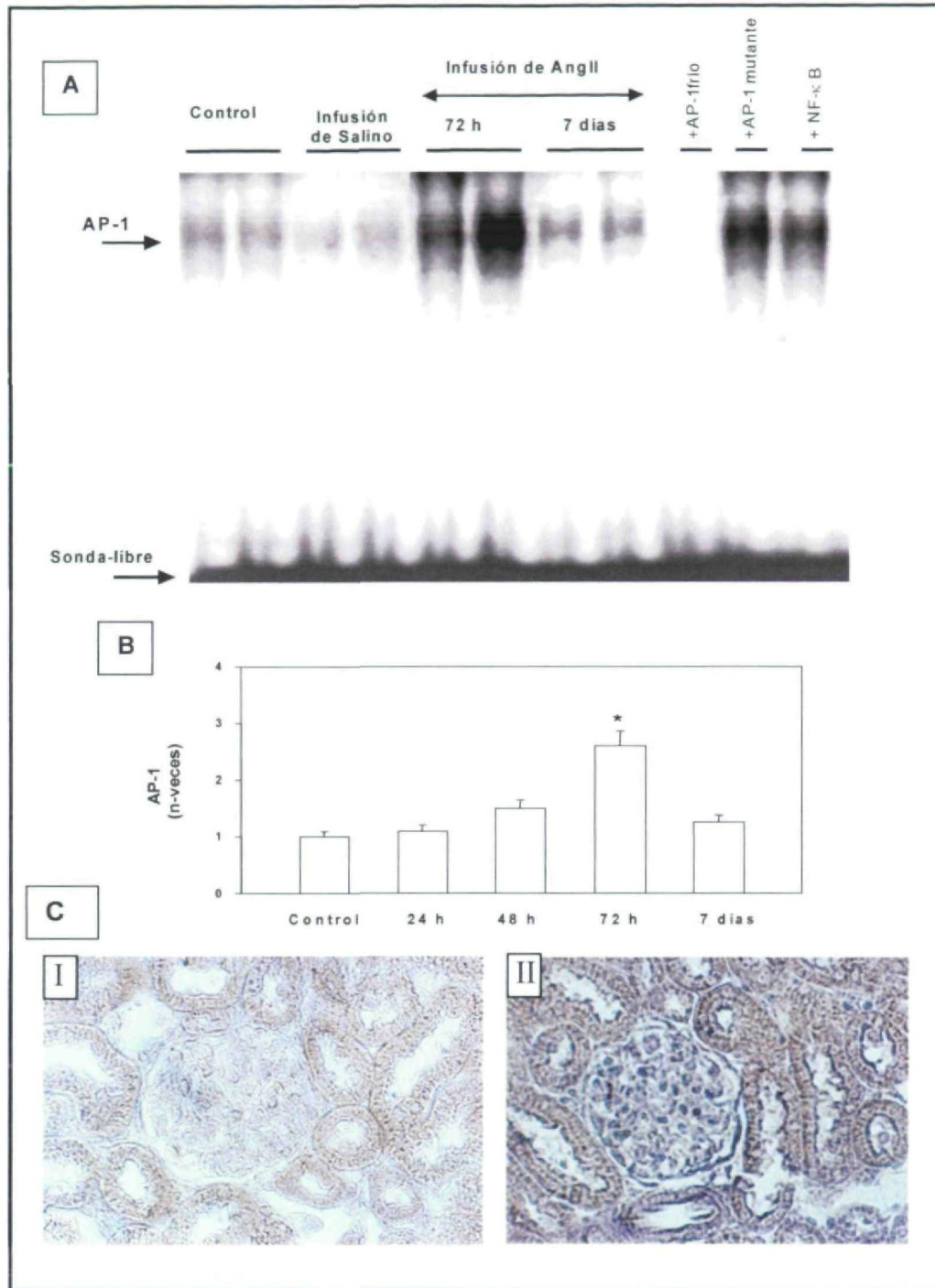


FIGURA 12. La infusión sistémica de AngII activa el AP-1 en el riñón. (A) En la figura se muestra un experimento de EMSA representativo de dos animales diferentes de cada grupo (controles e infundidos con AngII 24, 48, 72h y 7 días). La especificidad de la reacción se obtuvo con un exceso (100 veces) de sonda consenso AP-1 no marcada (competidor específico), con AP-1 mutante o con oligonucleótido no relacionado (NF-κB). La posición de los complejos AP-1 y el oligonucleótido libre está indicada en la figura. (B) Análisis densitométrico de los resultados expresados como unidades arbitrarias de la media ± EEM de 4 a 6 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ vs control. (C) Southwestern para AP-1 en ratas infundidas con AngII. En animales control (CI) no se detectó señal para AP-1, pero tras la infusión de AngII durante 72h (CII) se detectó una clara tinción nuclear para AP-1, en el túbulo y glomérulo.

El tratamiento con el antagonista AT_1 Losartan bloqueó el efecto de la AngII en la actividad renal del AP-1 (90% inhibición vs infusión de AngII, $n=4$, $p<0.05$), mientras que el pretratamiento simultáneo con el antagonista AT_2 PD123319 no tuvo ningún efecto (figura 13).

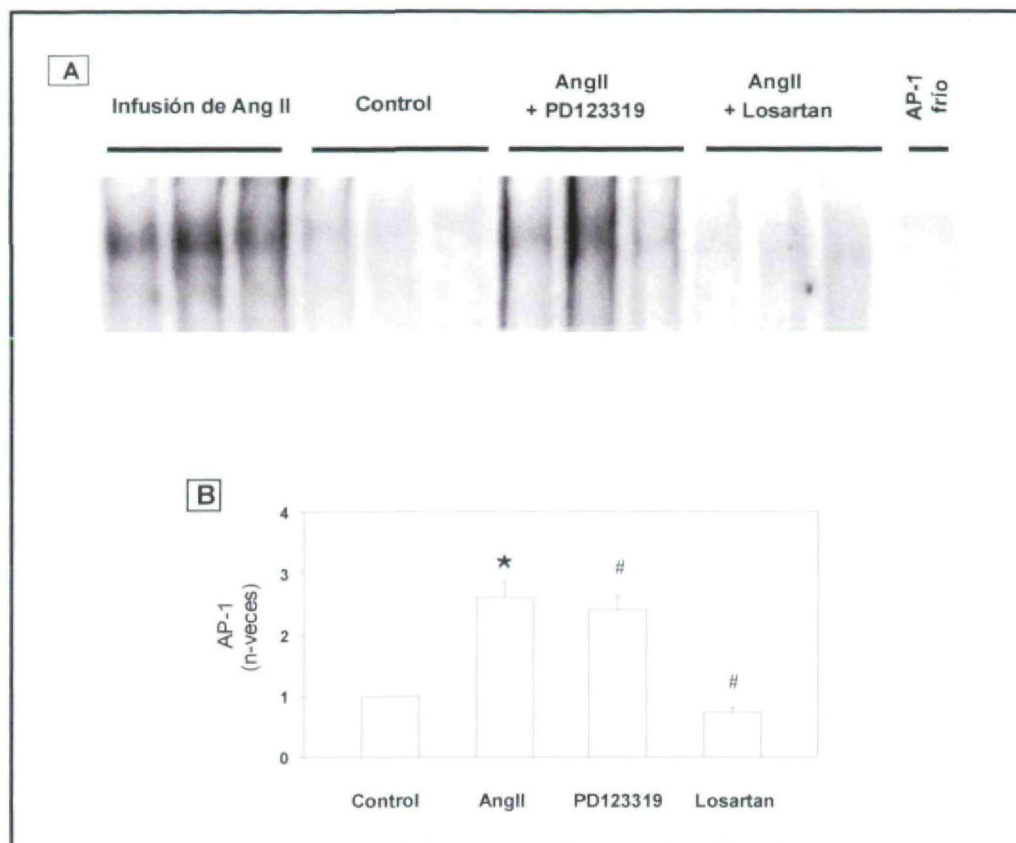


FIGURA 13. La infusión de AngII activa el AP-1 vía AT_1 en el riñón. (A) Extractos de corteza renal fueron aislados de ratas infundidas durante 72h. Posteriormente se separaron por electroforesis junto a un oligonucleótido de AP-1 marcado radioactivamente con γ -ATP. En la figura se muestra un EMSA representativo de tres diferentes de cada grupo. (B) Análisis densitométrico de los resultados expresados como unidades arbitrarias de la media \pm EEM de 4 a 6 animales de cada grupo. * $p<0.05$ vs control; # $p<0.05$ vs infusión de AngII.

En conclusión la infusión de AngII, además de activar NF- κ B, es capaz de inducir la activación de AP-1, principalmente a través del receptor AT_1 , a nivel glomerular y tubular.

6. La AngII induce la producción de mediadores proinflamatorios en el riñón

6.1 La AngII aumenta la producción de TNF- α renal

A continuación evaluamos si la AngII *in vivo* tenía algún efecto en los niveles de citoquinas como el TNF- α que participa en procesos de inflamación y fibrosis. En riñones de ratas infundidas con AngII durante 72h la AngII indujo un claro aumento de TNF- α , a nivel glomerular, y en menor medida en los túbulos (figura 14).

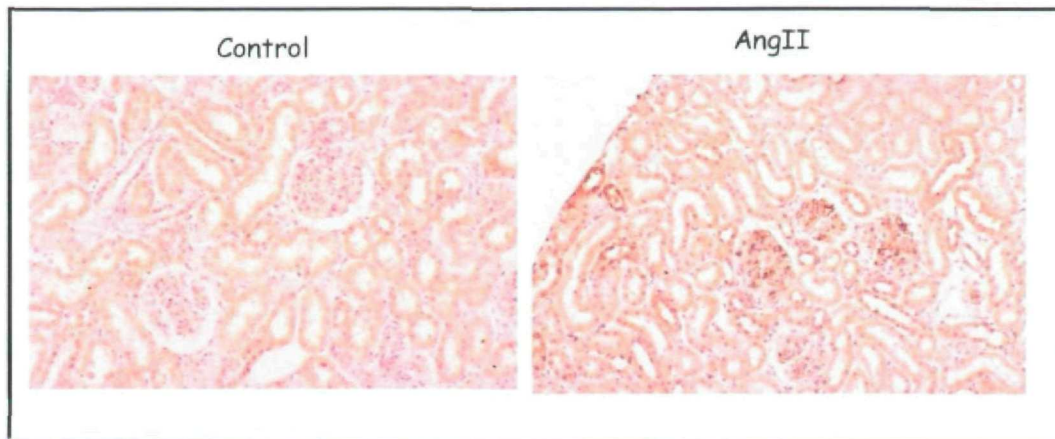


Figura 14. La infusión sistémica de AngII aumenta la producción renal de la citoquina TNF- α . Secciones renales de ratas control o infundidas con AngII durante 72h fueron analizadas con un anticuerpo frente a la citoquina TNF- α . Las figuras muestran un animal representativo de cada grupo. Aumento 200X.

6.2. La infusión de AngII aumenta la producción de otros mediadores del daño renal.

El CTGF (Connective Tissue Growth Factor) es un nuevo factor implicado en procesos de fibrosis. La expresión del CTGF está aumentada en diversas patologías, como aterosclerosis, fibrosis de la piel, cáncer, daño hepático y diversas nefritis experimentales y humanas [138,177]. Muchas de estas situaciones se caracterizan por una activación del RAS local. En células mesangiales y fibroblastos, el CTGF es un mediador de los efectos del TGF- β en la proliferación celular y en el aumento de matriz extracelular [178]. Algunos de los efectos hipertróficos de la AngII están mediados por factores de crecimiento, como el TGF- β y el PDGF [170,179,180]. El TGF- β ha sido considerado como el factor profibrogénico más importante en la regulación de la matriz extracelular [179,180]. Recientemente se ha descrito que un nuevo mediador profibrogénico, el CTGF, puede ser el responsable de las acciones del TGF- β [181].

Sin embargo, la relación *in vivo* entre el RAS y el CTGF no ha sido abordada. En la figura 15 demostramos que la infusión sistémica en ratas normales de AngII aumenta la síntesis de CTGF en riñón (principalmente en glomérulo). Además, el tratamiento con Losartan, y no con PD123319 bloqueó este efecto, por lo que podemos sugerir que el receptor AT₁ está implicado en este proceso.



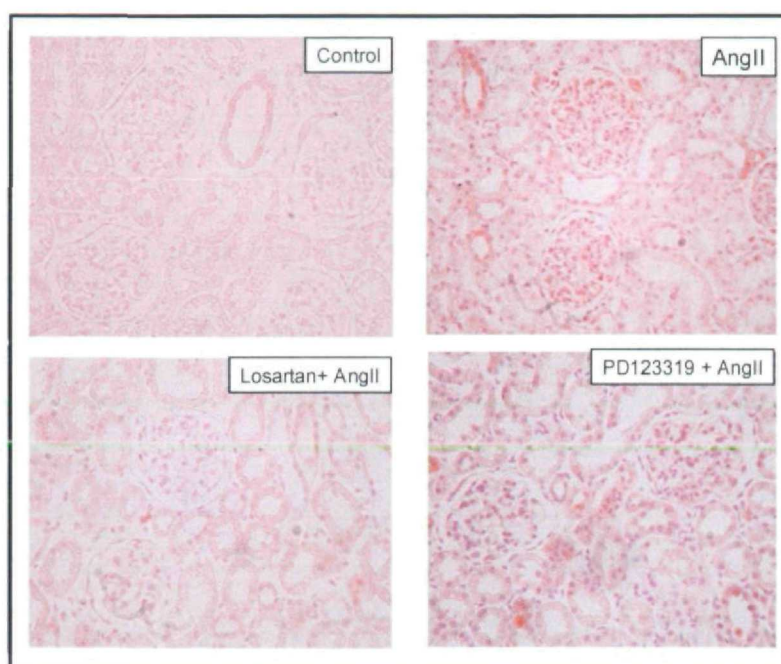


Figura 15. La AngII induce la producción de CTGF renal. Secciones renales de ratas control o infundidas con AngII durante 72h fueron analizadas por inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal frente al CTGF. La infusión de AngII aumenta los niveles de CTGF en riñón (principalmente en el glomérulo). A diferencia que con el antagonista PD123319 (antagonista AT_2), el pretratamiento con Losartan (antagonista del AT_1) redujo los niveles de CTGF en riñón.

Por otro lado, existen datos experimentales que sugieren la existencia de una relación entre el RAS y la PTHrP (Parathyroid hormone (PTH)-related protein) [182]. Esta proteína tiene propiedades hipotensoras, es mitogénica para células renales y se encuentra aumentada en aorta de ratas hipertensas, en células vasculares tratadas con AngII, en respuesta al aumento de sodio en la dieta, y en situaciones de daño renal [132,183]. Sin embargo, se desconoce si la AngII de forma directa e independiente del aumento de presión sanguínea regula la expresión de la PTHrP en riñón y vasos.

Como se puede observar en la figura 16, la infusión de AngII durante 72 h provocó un aumento de la producción de PTHrP renal (en glomérulo y túbulo). Además, al igual que el CTGF, el pretratamiento con Losartan disminuyó la tinción, sugiriendo que este proceso es inducido a través del receptor AT_1 en riñón.

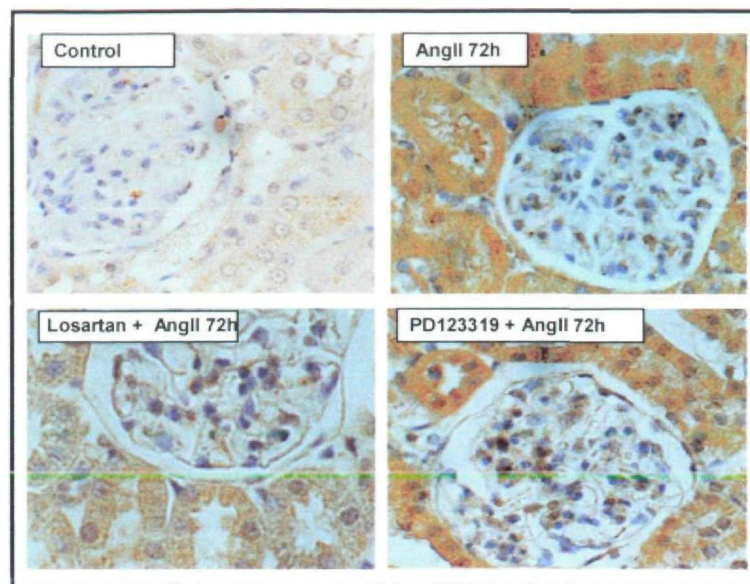


Figura 16. La AngII estimula la producción de PTHrP en riñón. Secciones renales de ratas control o infundidas con AngII durante 72h fueron analizadas por inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal frente a la PTHrP. Otras ratas fueron pretratadas con los antagonistas AT_1 Losartan o AT_2 PD123319). La síntesis de PTHrP a nivel renal es incrementada por AngII (en glomérulo y túbulo) a través del receptor AT_1 .

Como resumen, hemos demostrado que la AngII activa factores de transcripción implicados en el daño renal (NF- κ B y AP-1) e induce la síntesis de proteínas que juegan un papel importante en estos procesos, como la citoquina TNF- α , factores de crecimiento como el CTGF, y agentes mitogénicos como la PTHrP. Todo ello sugiere que la AngII pueda jugar un papel importante en la progresión del daño renal.

7. Efecto de la infusión sistémica de AngII a nivel vascular. Activación de NF- κ B.

Previamente algunos autores han demostrado *in vitro* en células endoteliales y de músculo liso vascular que la AngII activa NF- κ B [184,253]. Por este motivo estudiamos si este efecto también ocurría *in vivo* en aortas de ratas infundidas durante 72h.

Mediante Southwestern investigamos si la infusión de AngII activa el factor nuclear NF- κ B en aorta, estudiando los tipos celulares implicados. En secciones de aorta de ratas control no se observó marcaje nuclear en ningún tipo celular, pero sin embargo en ratas infundidas con AngII durante 72 horas detectamos un incremento del marcaje nuclear para NF- κ B, localizado en células endoteliales y de músculo liso vascular (figura 17). Estos datos concuerdan con los previamente mostrados en arterias renales (figura 6). Los ensayos de competición se realizaron con un exceso (100 veces) de oligonucleótido de NF- κ B frío, con un oligo mutante marcado con digoxigenina (100 pM), o en ausencia de oligo marcado de NF- κ B, con el fin de demostrar la especificidad de la reacción. Estos datos sugieren un efecto directo de la AngII en la regulación de la actividad de NF- κ B en vaso.

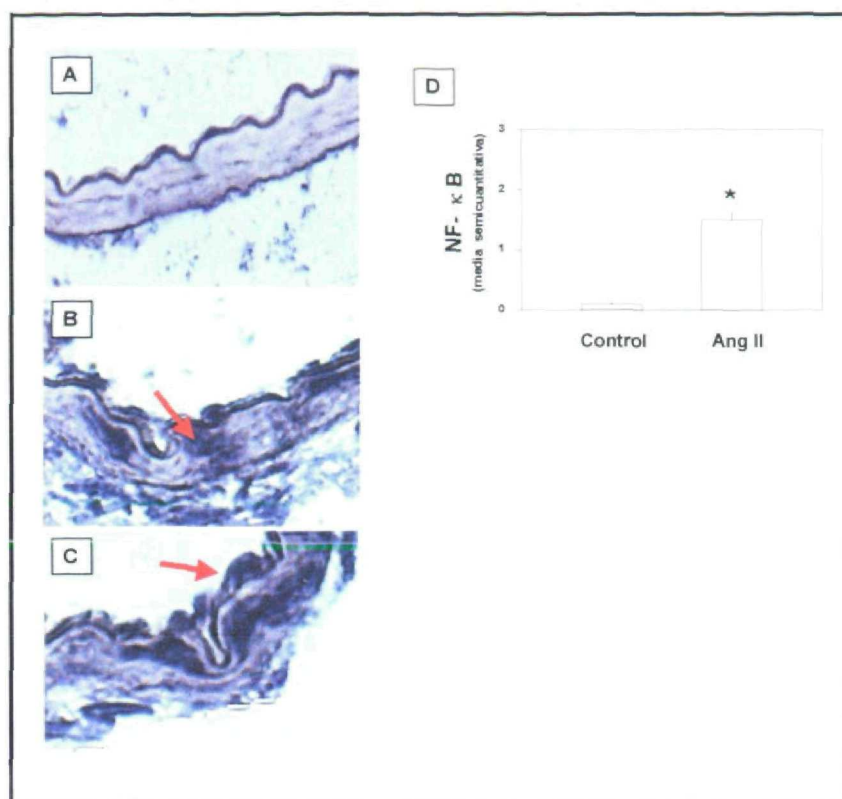


Figura 17. La infusión sistémica de AngII activa NF-κB en aorta. Mediante Southwestern observamos que las ratas control no presentaban marcaje para NF-κB (A). En ratas infundidas con AngII durante 72h detectamos un claro marcaje para NF-κB localizado en células de músculo liso vascular (B) y en células endoteliales (C). (D) Análisis semicuantitativo del marcaje de NF-κB, siendo (-) no marcaje, (1+) medio, (2+) moderado, (3+) intenso. Los resultados son expresados como media \pm EEM de 4 animales por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

7.1 La infusión de AngII aumenta la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios en vaso.

En secciones de aorta de ratas infundidas con AngII observamos un aumento de la citoquina proinflamatoria TNF- α , al igual que sucedía en riñón. Como podemos comprobar en la figura 18, la AngII provocó un incremento de la tinción positiva para TNF- α , principalmente en células de músculo liso vascular.

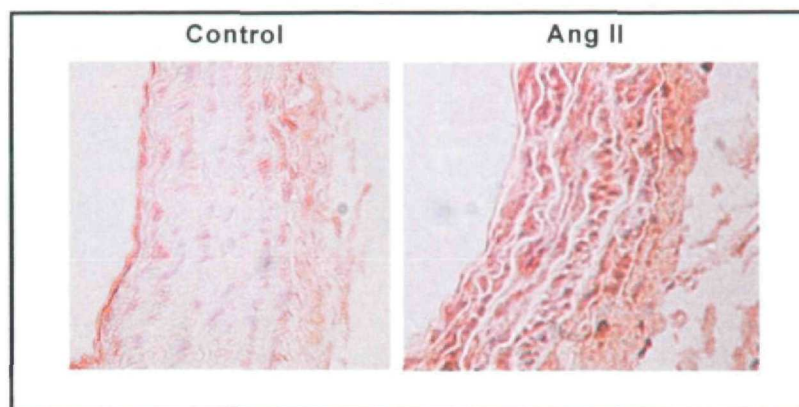


Figura 18. La infusión de AngII produce aumento de TNF- α . Secciones de aorta torácica de rata fueron analizadas por inmunohistoquímica con un anticuerpo frente al TNF- α . En la parte de la izquierda podemos observar una aorta representativa de ratas control, y a la derecha, una de ratas infundidas con AngII durante 72h.

Además estudiamos el efecto de la infusión de AngII en la síntesis de CTGF vascular. En la figura 19 observamos que la AngII (72h) aumenta la síntesis de CTGF en células endoteliales y, principalmente, en células de músculo liso vascular.

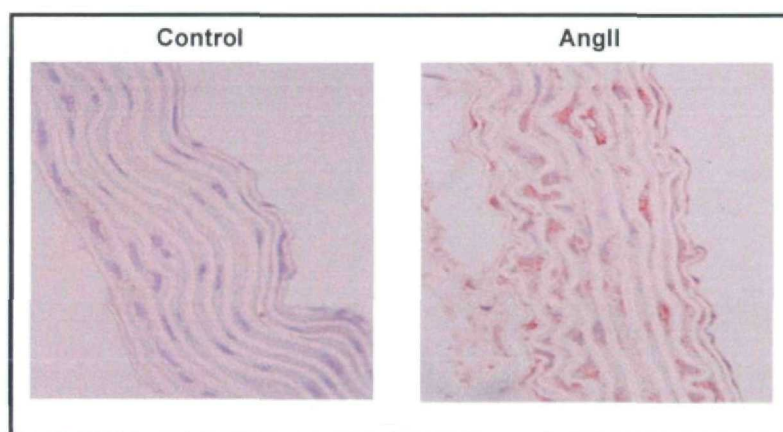


Figura 19. La AngII induce la producción de CTGF vascular. Mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo frente al CTGF observamos que la infusión de AngII (72h) aumenta los niveles de este factor en aorta (principalmente en células de músculo liso vascular).

Finalmente estudiamos el efecto de la AngII *in vivo* en la producción de PTHrP. Como se puede observar en la figura 20, en secciones de aorta de rata la infusión de AngII durante 72 h provocó un aumento de los niveles de PTHrP (en células endoteliales y de músculo liso vascular), al igual que sucedía en riñón.

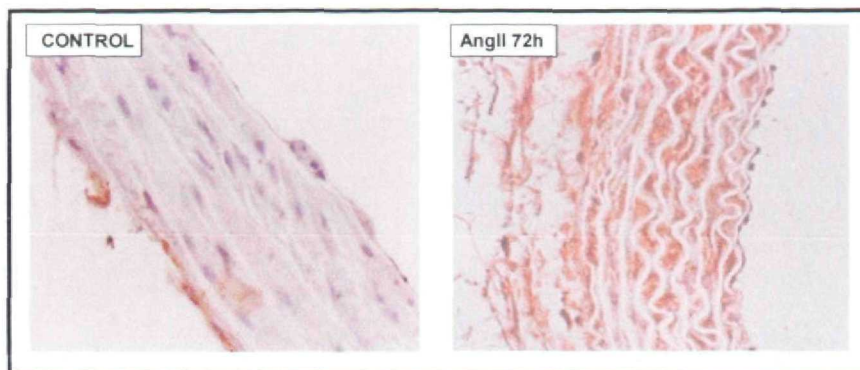


Figura 20. La AngII estimula la producción de PTHrP en vaso. Mediante estudios inmunohistoquímicos con un anticuerpo frente a la PTHrP detectamos un aumento de la síntesis de PTHrP a nivel vascular (en células endoteliales y de músculo liso vascular) inducido por AngII (72h).

En conclusión, estos resultados sugieren que la AngII a nivel vascular es capaz de activar el factor NF- κ B y de estimular la producción de agentes proinflamatorios, profibróticos y mitogénicos, como el TNF- α , CTGF y PTHrP, todos ellos asociados a situaciones de daño vascular.

II. ESTUDIOS *IN VITRO*

Para comenzar los estudios *in vitro* primero analizamos la expresión de los receptores de Angiotensina en células renales y vasculares en cultivo. El conocimiento de estos receptores, así como los mecanismos involucrados en la unión con péptidos del sistema SRA, es un área de investigación muy importante para el estudio de enfermedades renales y cardiovasculares. Previamente otros autores han detectado y localizado el receptor AT₁ en células renales (mesangiales glomerulares, tubulares, epiteliales), y en células vasculares de músculo liso [28,29,46]. Sin embargo, no se conocen muy bien los niveles del receptor AT₂ en estas células.

1. Localización de los receptores AT₂ en el riñón y en células en cultivo.

Actualmente existe una cierta controversia con respecto a la existencia de receptores AT₂ en el riñón. Varios investigadores han intentado detectar estos receptores en riñón y en células en cultivo, principalmente mediante estudios de desplazamiento de la unión de ¹²⁵I-AngII, con antagonistas específicos de los AT₂, y por Northern blot [29,38]. Sin embargo, estudios recientes han mostrado, mediante inmunohistoquímica, Western blot y RT-PCR, la presencia de receptores AT₂ a nivel renal [36,38].

En este trabajo determinamos mediante RT-PCR la expresión del mRNA del receptor AT₂ en células en cultivo y en corteza renal. Las células (mesangiales glomerulares, epiteliales tubulares y de músculo liso vascular) fueron incubadas durante 48h en RPMI en ausencia de suero. Tras el periodo de deplección, se aisló el RNA celular para analizarlo por RT-PCR, observando que todas las células presentan una banda con un tamaño aproximado de 710 pb similar a la observada en corteza renal de riñón sano, correspondiente al mRNA del receptor AT₂ (figura 21A). Además estudiamos la presencia de AT₂ en situaciones patológicas. En un modelo de nefritis inmune (por ovoalbúmina) observamos un aumento de la expresión de la ECA renal que da lugar a un incremento de la síntesis local de AngII, y el tratamiento con iECAs disminuye la proteinuria sin variar la presión sanguínea. Interesantemente, en estos animales con nefritis se observó una gran tinción glomerular con el anticuerpo frente al AT₂ [30]. Como control positivo utilizamos extracto de mRNA de glándula adrenal donde previamente se había descrito el AT₂ expresado [57].

Mediante inmunohistoquímica, secciones de riñón de rata fueron incubadas con un anticuerpo policlonal específico frente al receptor AT₂, observándose la localización de éste en el riñón. En animales sanos detectamos tinción positiva para este receptor localizada principalmente en células epiteliales tubulares, y con menor intensidad a nivel glomerular (figura 21B). Semejante distribución se encontró en animales con nefritis inmune, pero se observó un marcado aumento de la expresión del AT₂ en glomérulo.

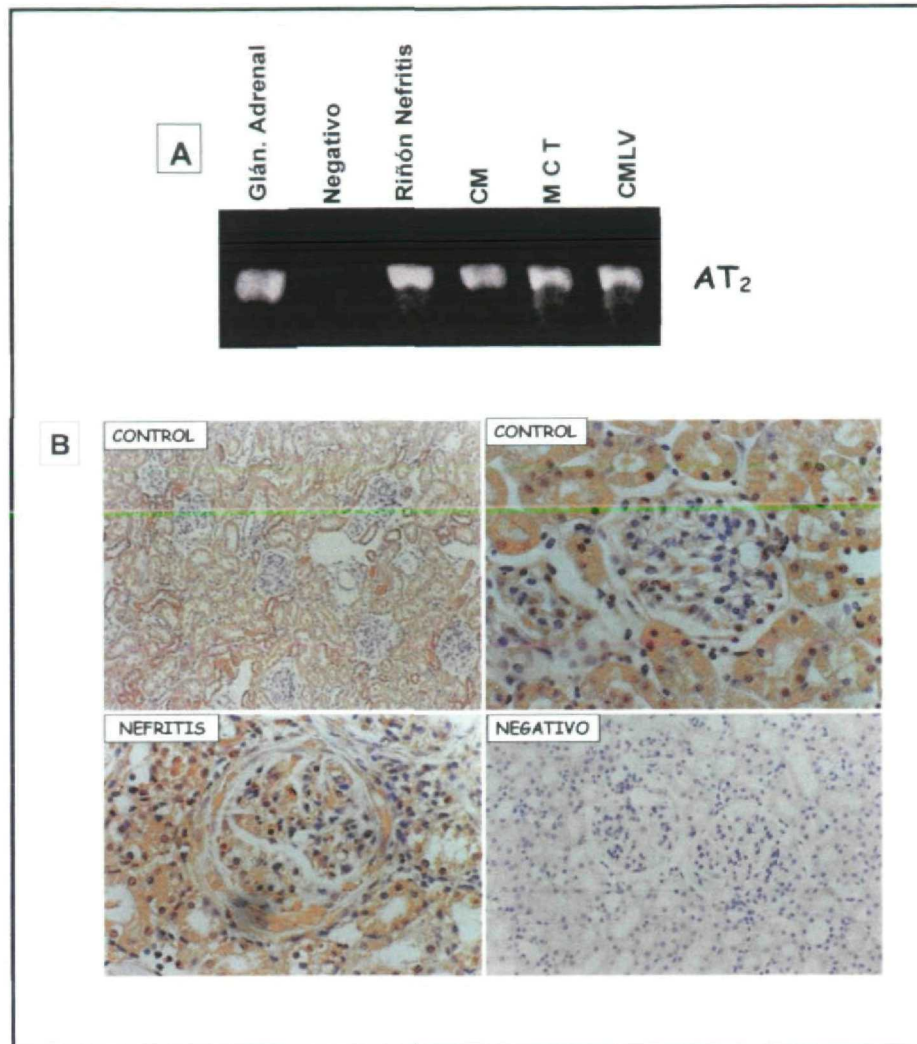


FIGURA 21. (A) Análisis de la expresión del receptor AT₂ en el riñón. Muestras de RNA total de corteza renal de rata de un modelo de nefritis inmune por ovoalbumina (OVA), y de células [glomerulares mesangiales (CM), tubuloepiteliales murinas (MCT) y vasculares (CMLV)], fueron analizadas por RT-PCR para determinar la expresión del receptor AT₂ (710 pb). Como control negativo se realizó la RT-PCR sin enzima, y como positivo, se utilizó RNA de glándula adrenal. La figura muestra un experimento representativo de 4 realizados. (B) Localización de los receptores AT₂. La figura muestra mediante inmunohistoquímica la presencia de AT₂ en animales control y en animales con nefritis inmune por OVA. Como control negativo, incubamos las muestras control en ausencia de anticuerpo primario.

Además en cultivos de células mesangiales y de músculo liso vascular en reposo (después de la incubación durante 48h con RPMI sin suero), analizamos los niveles de los receptores AT₂ por Western blot (figura 22A). Para ello se aislaron los extractos proteicos citosólicos, se separaron por electroforesis, y se transfirieron a membranas, las cuales fueron incubadas con un anticuerpo específico para el receptor AT₂. En ambas células se observó una banda de 42 KDa correspondiente al tamaño esperado. Estos datos fueron confirmados en células vasculares por inmunohistoquímica, observándose tinción positiva para los receptores AT₁ y AT₂ (figura 22B).

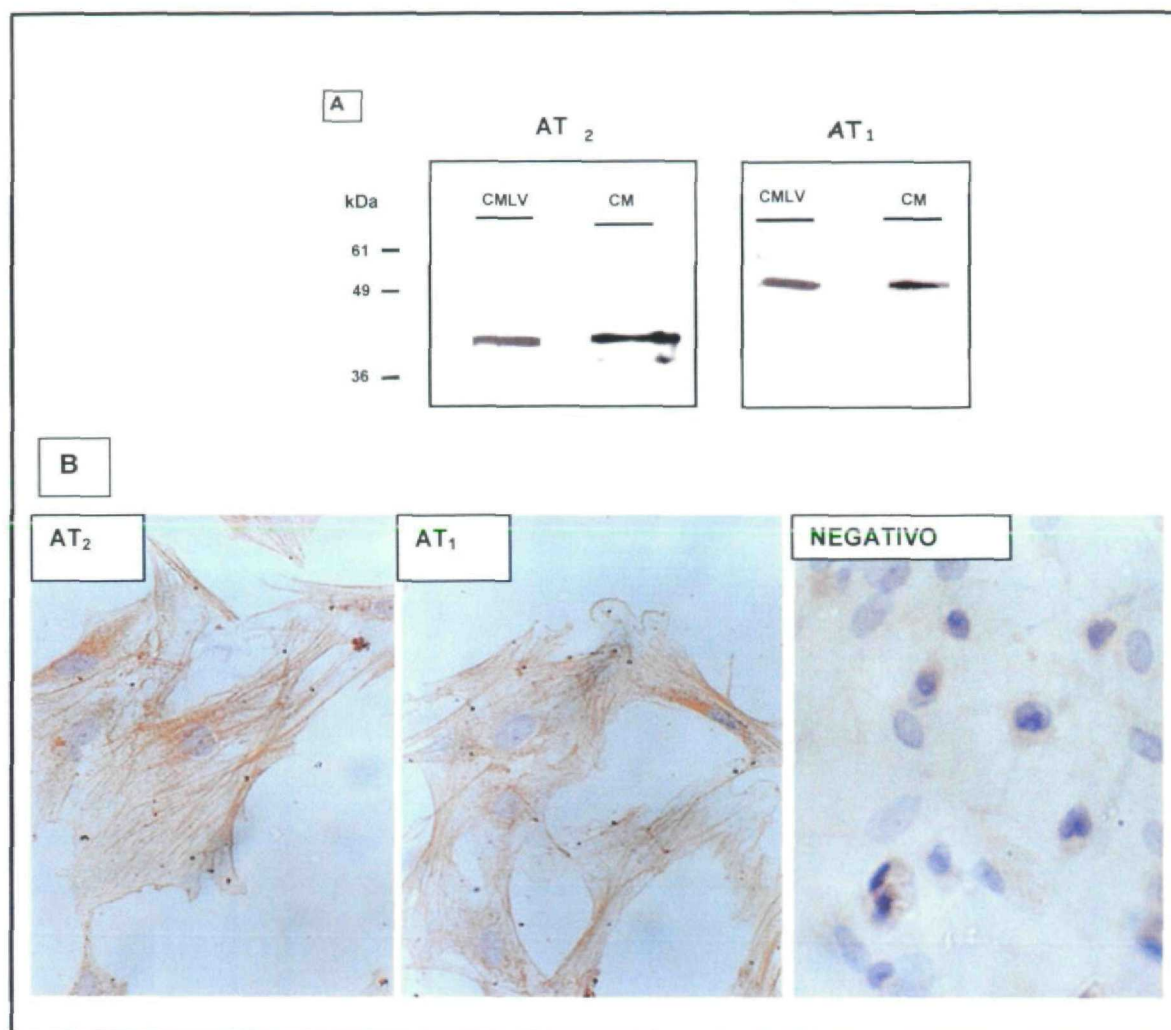


Figura 22. (A) Determinación de los receptores AT_1 y AT_2 . Las células vasculares y mesangiales, quiescentes, expresan los receptores AT_2 (banda de 42 kDa) y AT_1 (50 kDa). En la figura se muestra un Western representativo de tres experimentos realizados. (B) Localización de los receptores AT_1 y AT_2 . Las células vasculares expresan ambos receptores como se muestra por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos policlonales frente a los receptores AT_1 y AT_2 . Como control negativo se incubó las células vasculares en ausencia de anticuerpo primario. Magnificación $\times 100$.

En conjunto, nuestros resultados confirman la existencia de niveles detectables del receptor AT_2 en el riñón [36,38], y además, en células mesangiales, tubulares y vasculares en cultivo. Estos datos corroboran los anteriormente descritos en células endoteliales glomerulares [74], de músculo liso vascular [36] y mesangiales provenientes de ratas Wistar [35].

2. La Angiotensina II activa los factores AP-1 y NF- κ B en células tubulares vía AT₁.

Como ya hemos observado en estudios *in vivo*, la AngII activa factores de transcripción en el túbulo renal. Con el objetivo de conocer si los efectos de AngII eran directos y no debidos a causas hemodinámicas o relacionadas con el aumento de presión sanguínea, y si nuestros datos de infusión a nivel tubular concordaban con lo que ocurría *in vitro*, evaluamos como afecta la estimulación directa de AngII en células epiteliales tubulares (línea celular MCTs). En primer lugar analizamos si la AngII aumenta la activación del factor de transcripción AP-1. Las MCTs en fase de reposo, se incubaron con AngII (10^{-7} - 10^{-9} mol/L) durante 30 o 60 min. Después de los periodos de incubación se aislaron las fracciones nucleares y determinamos la actividad de AP-1 mediante ensayos de unión de las proteínas nucleares al oligonucleótido de AP-1 marcado radioactivamente con γ -[32 P]-ATP, y análisis por EMSA. Como podemos observar en la figura 23A, la AngII provocó un aumento en la activación del factor AP-1, de forma dosis-tiempo dependiente, con un efecto máximo tras 60 min de incubación y a la concentración de 10^{-7} mol/L (4.0 veces vs control, $n=4$, * $p<0.05$). Para conocer el receptor implicado en este proceso, preincubamos las células 30 min con los antagonistas de los receptores (Losartan y PD123319 para AT₁ y AT₂, respectivamente) y posteriormente las estimulamos con AngII (10^{-7} mol/L) durante 60 min. Después del periodo de incubación, aislamos los extractos nucleares y observamos por EMSA que en MCTs tan sólo el Losartan bloqueó la activación del AP-1 inducida por AngII, mientras que el antagonista del receptor AT₂ no producía efecto inhibitorio (52% y 5% vs AngII sólo, para Losartan y PD123319 respectivamente) (figura 23A).

En segundo lugar nos ocupamos de analizar el efecto de la AngII en la activación del factor NF- κ B en nuestras células tubulares en cultivo. Las MCTs quiescentes, se incubaron con AngII (10^{-7} , 10^{-9} y 10^{-11} mol/L, no mostrados) desde 15 hasta 120 min. Transcurrido los tiempos de incubación, los extractos nucleares fueron aislados y se determinó la actividad del NF- κ B mediante ensayos de unión de las proteínas nucleares al oligonucleótido de NF- κ B marcado radioactivamente, y análisis por EMSA. En células tubulares, la AngII activó el NF- κ B con una respuesta máxima al cabo de 30 min de incubación y a la dosis de 10^{-9} mol/L (3.1-veces sobre control, $n=5$, $p<0.05$) (figura 23B). Mediante el empleo farmacológico con los antagonistas AT₁ y AT₂ determinamos el receptor implicado en la activación del NF- κ B en estas células. Las células tubulares, en estado de reposo, fueron preincubadas durante 30 min con los antagonistas de los receptores AT₁ (Losartan), y AT₂ (PD123319) (rango de dosis 10^{-5} mol/L a 10^{-7} mol/L), y posteriormente se estimularon con 10^{-9} mol/L AngII durante 30 min. El Losartan disminuyó de forma dosis dependiente la activación del NF- κ B inducida por AngII, máximo a 10^{-5} M (79% vs AngII, $n=6$, $p<0.05$), mientras que el PD123319 (10^{-5} mol/L) sólo causó una ligera disminución (35% vs AngII, $n=6$; Figura 23B).

Estos datos confirman que la AngII activa AP-1 y NF- κ B principalmente vía AT₁, en túbulos de ratas infundidas con AngII y además en cultivos de células epiteliales tubulares.

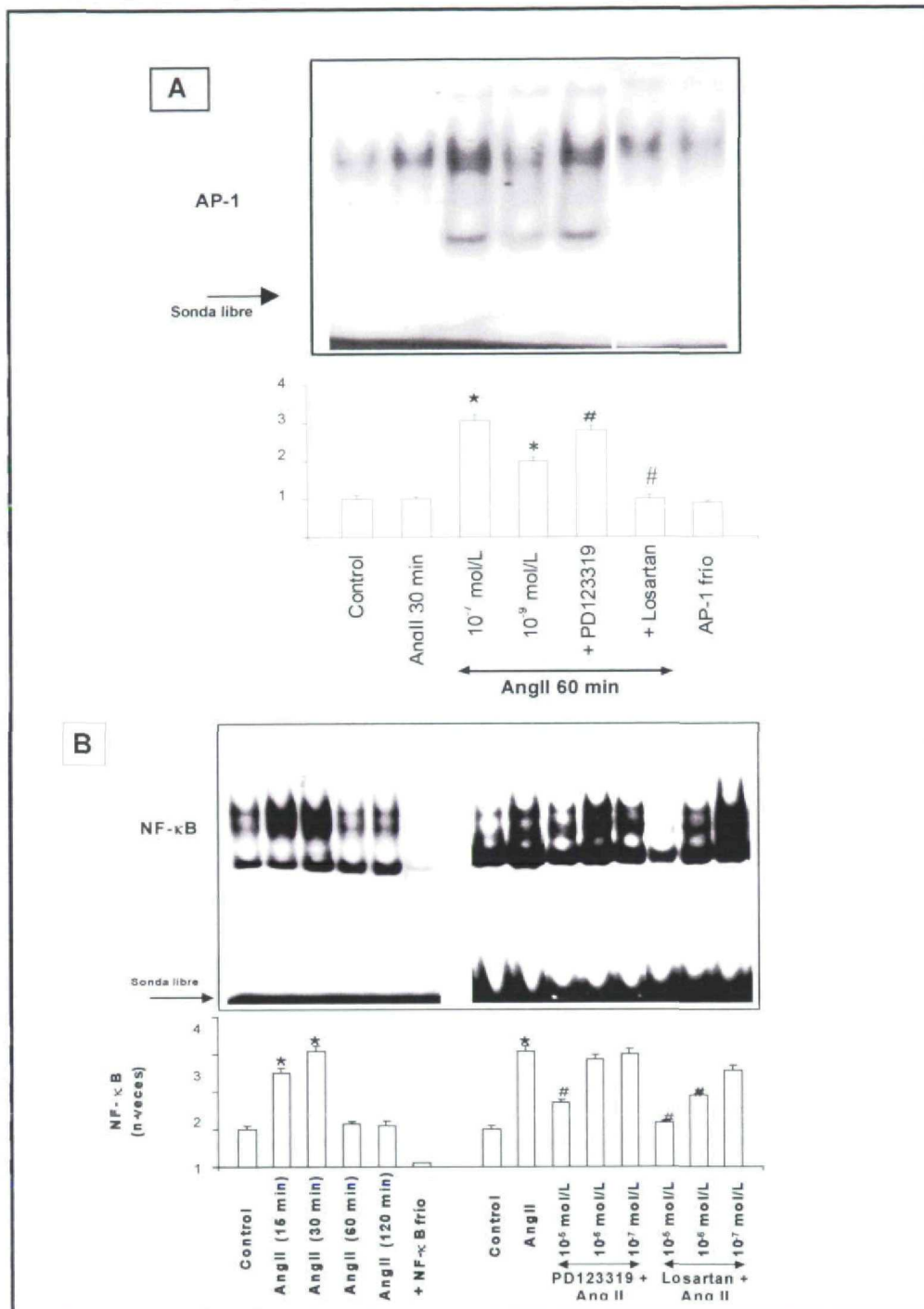


FIGURA 23. Efecto de la AngII en la activación del AP-1 (A) y NF-κB (B) en células tubuloepiteliales murinas (MCT). Las MCTs quiescentes, fueron tratadas con 10⁻⁹ mol/L AngII durante distintos tiempos. Los extractos nucleares se aislaron y se analizó la actividad de AP-1 o NF-κB por EMSA. En algunos casos, las células fueron preincubadas durante 30 min con Losartan o PD123319, y posteriormente estimuladas con AngII 10⁻⁹ mol/L durante 60 o 30 min. La especificidad de la reacción fue establecida utilizando ensayos de competición con un exceso (100-veces) de oligonucleótido no marcado. Las figuras muestran en el panel superior un EMSA representativo, y en el inferior, el análisis densitométrico de los resultados como unidades arbitrarias de la media ± EEM de 6 experimentos. *p<0.05 vs control; # p<0.05 vs AngII sólo. La posición de los complejos específicos de AP-1/NF-κB, y del oligonucleótido libre, está indicada.

3. Efecto de la AngII en la activación de factores de transcripción en células implicadas en el daño tisular:

Previamente se ha demostrado que además de las células tubulares, existían otras células implicadas en el daño renal como son las células mesangiales y mononucleares [5,60,62]. Además, las células vasculares tienen un papel fundamental en hipertensión y enfermedades cardiovasculares [70,71]. En todas estas células se ha demostrado una activación del factor AP-1 inducido por AngII [148,165,187]. Sin embargo, el papel del NF- κ B y los receptores implicados en estos procesos, no han sido totalmente esclarecidos.

3.1 La Angiotensina II activa el NF- κ B en células vasculares, mesangiales glomerulares y mononucleares vía AT₁ y AT₂.

Las células vasculares en estado de reposo fueron tratadas con AngII (10^{-9} mol/L) durante 30 o 60 min. En otros experimentos, las células fueron preincubadas durante 30 min con los antagonistas AT₁ (Losartan), y AT₂ (PD123319) (rango de dosis 10^{-5} mol/L a 10^{-7} mol/L), y posteriormente se estimularon con 10^{-9} mol/L AngII durante 30 y 60 min. Como podemos ver en la figura 24A, ambos antagonistas bloquearon la activación del NF- κ B inducida por AngII, tanto a los 30 como a los 60 min de estimulación, aunque la inhibición fue algo mayor a los 30 min. El efecto de ambos antagonistas fue además dosis dependiente, observándose una máxima respuesta a la concentración de 10^{-5} mol/L (88% y 84% inhibición vs AngII sólo, para Losartan y PD123319 respectivamente, $n=6$, $p<0.05$). Sin embargo, ninguno de estos antagonistas por sí mismo afectó significativamente la actividad de NF- κ B en células control (0.94- y 1-veces vs control, respectivamente, $n=6$, $p=ns$) (figura 24B). La presencia simultánea de ambos antagonistas produjo un efecto inhibitorio aditivo, disminuyendo los niveles del NF- κ B hasta valores controles (96% inhibición vs AngII sólo, 10^{-6} mol/L, $n=3$).

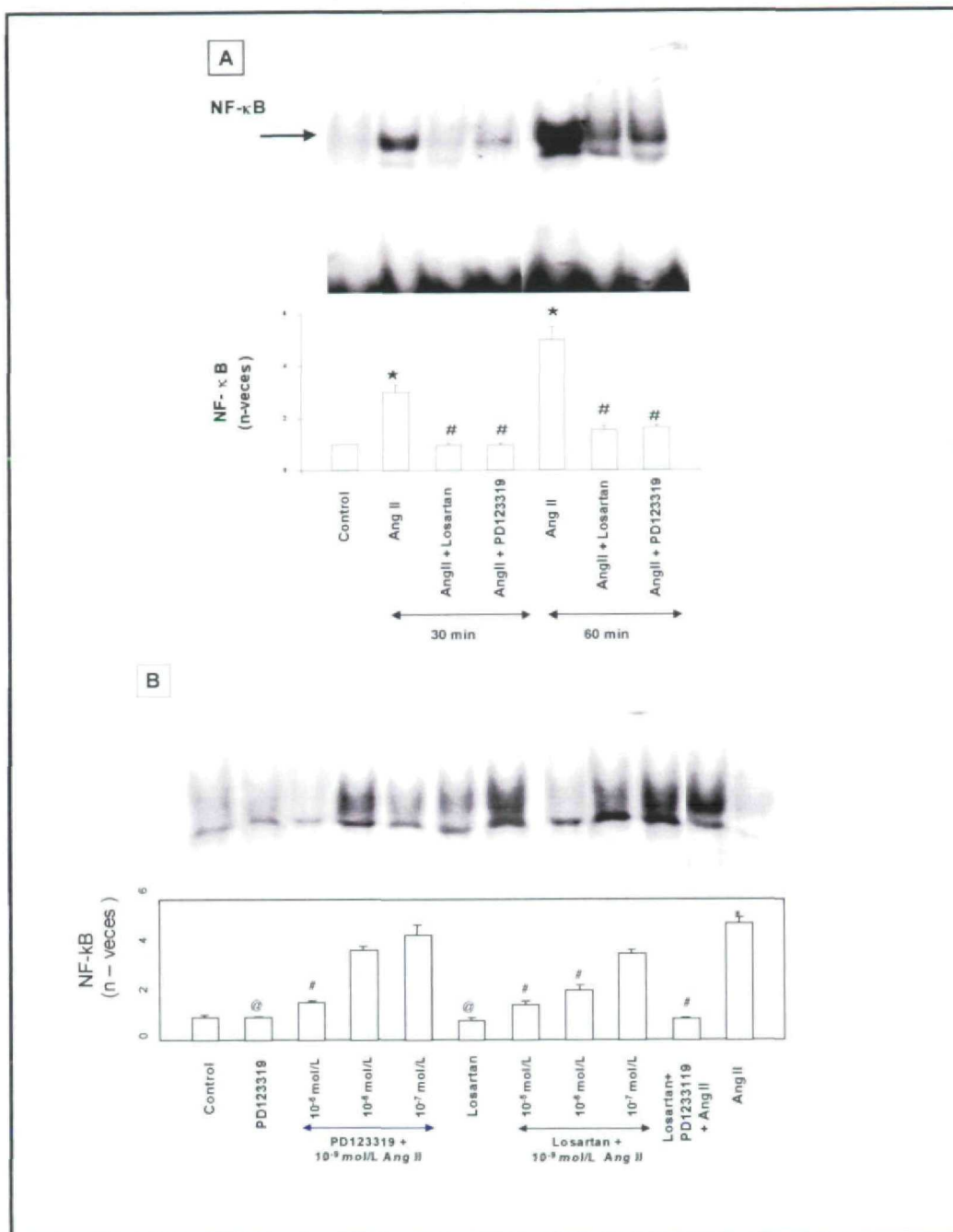


FIGURA 24. La AngII activa NF-κB a través de los receptores AT₁ y AT₂ en células vasculares. (A) Las células fueron preincubadas 30 min con el antagonista del receptor AT₁, Losartan (10⁻⁶ mol/L) o con el del AT₂, PD123319 (10⁻⁵ mol/L), y posteriormente estimuladas con AngII (10⁻⁹ mol/L) durante 30 o 60 min. (B) Las células fueron pretratadas durante 30 min con Losartan o PD123319 sólo (10⁻⁵ a 10⁻⁷ mol/L) o en combinación (10⁻⁵ mol/L), y posteriormente estimuladas con AngII (10⁻⁹ mol/L) durante 60 min. Ambos antagonistas no tuvieron efecto alguno a la dosis de 10⁻⁵ mol/L en la actividad de NF-κB en células control. En A y B, las figuras muestran en la parte superior los experimentos representativos de 7-10 EMSAs diferentes realizados. Los valores de las medias ± EEM obtenidos por análisis densitométricos, están mostrados en la parte inferior. *p<0.05 vs control; #p<0.05 vs AngII sola; @p<0.05 vs control

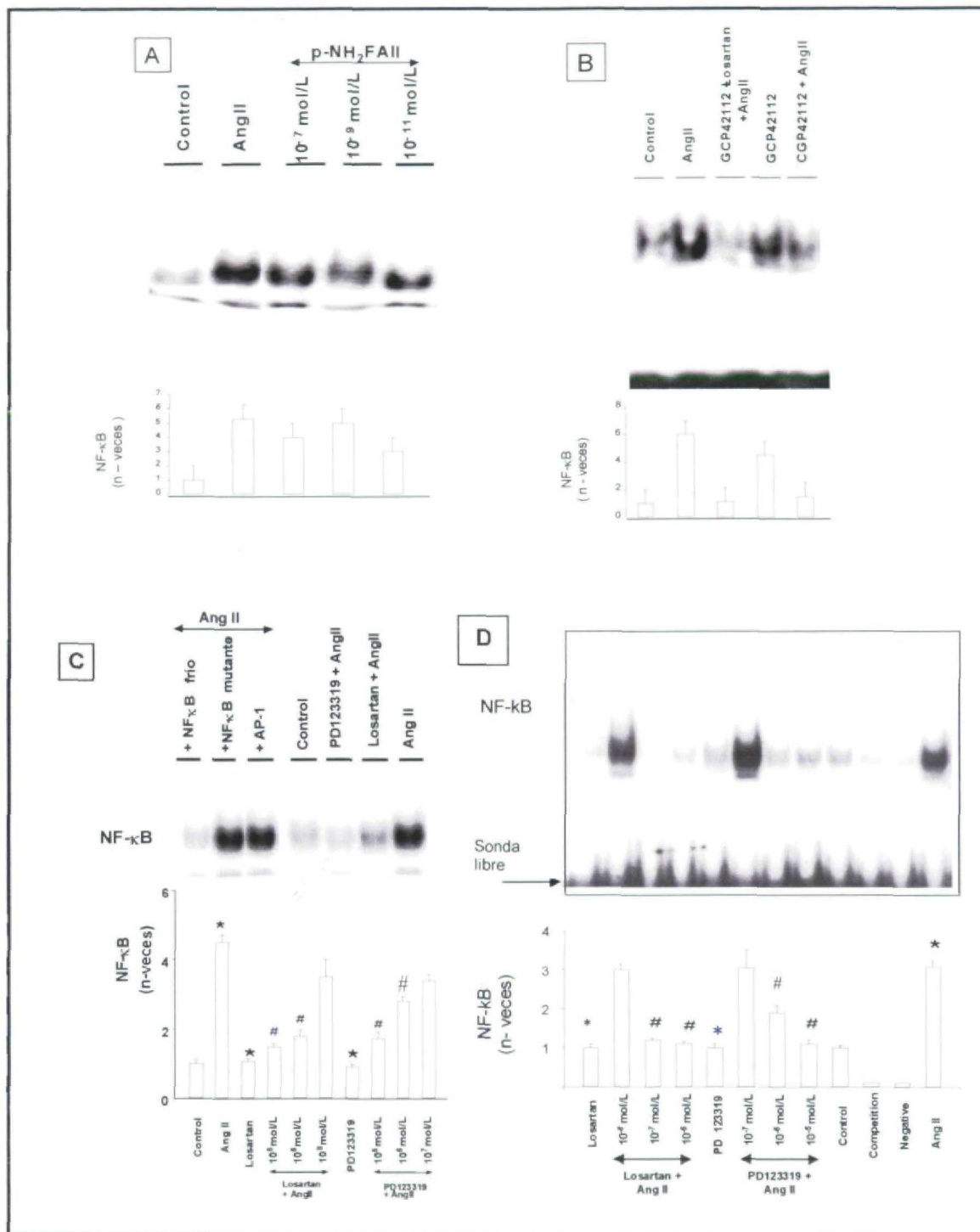


Figura 25. (A) Un agonista del receptor AT₂ activa NF-κB. Las células vasculares se incubaron con p-aminofenilalanina⁶-AngII (pNH₂FAII) (10^{-7} a 10^{-11} mol/L) durante 60 min. (B) Otro antagonista del receptor AT₂ bloquea la activación de NF-κB inducida por AngII. Las células vasculares se incubaron con GCP42112 (10^{-5} mol/L) sólo o con Losartan (10^{-6} mol/L) durante 60 min, y posteriormente con AngII (10^{-7} mol/L). La AngII activa NF-κB a través de los receptores AT₁ y AT₂ en células mesangiales glomerulares (C) y mononucleares (D). Ambos tipos celulares fueron pretratados con Losartan o PD123319 y posteriormente con AngII (10^{-7} mol/L). Ni Losartan ni PD123319 sólo tuvieron efecto en células control. Para el control negativo se realizó el EMSA sin extracto nuclear. En todos los casos, en la parte superior se muestra un gel representativo, y en la inferior, al análisis densitométrico de la media ± EEM. *p<0.05 vs control y #p<0.05 vs AngII.

Para confirmar el subtipo de receptor asociado a la activación del NF- κ B empleamos un agonista de los receptores AT₂, el p-aminofenilalanina⁶-AngII (p-NH₂FAII) [33]. En células vasculares, el tratamiento con p-NH₂FAII (10⁻⁷ mol/L-10⁻¹¹ mol/L) durante 60 min activó el NF- κ B de manera dosis dependiente (figura 25A), con una respuesta máxima a la dosis de 10⁻⁹ mol/L y con intensidad comparable a la AngII (5-veces, n=3, p<0.05). También se realizaron experimentos con el CGP42112 (ácido Tyr-(N-benciloxicarbonil-Arg)Lis-His-Pro-Ile-OH nicotínico), que tiene afinidad por el receptor AT₂ [35]. Este compuesto presentó propiedades agonistas del AT₂ al activar el NF- κ B (máxima a 10⁻⁵ mol/L; 4.5-veces, n=4, p=0.05), pero además se comportó como antagonista al bloquear parcialmente el efecto de la AngII (82% inhibición vs AngII sola, n=4, p<0.05). El GCP42112 en combinación con el Losartan disminuyó la activación de NF- κ B a niveles controles (figura 25B).

En células mesangiales la presencia en el medio de cultivo de los antagonistas Losartan o de PD123319 provocó igualmente una inhibición de la activación del NF- κ B inducida por AngII (54% y 60 % inhibición, respectivamente) (figura 25C). Por otro lado, se ha demostrado en estudios previos que en células mononucleares humanas la AngII regula NF- κ B [168] y que estas células poseen todas los componentes del SRA, incluyendo los receptores AT₁ y AT₂ [189]. Así, en monocitos (línea celular U937), el pretratamiento con antagonistas AT₁ o AT₂ (10⁻⁵ a 10⁻⁸ mol/L) disminuyó de forma dosis dependiente la actividad NF- κ B inducida por la AngII (63% y 65% inhibición para Losartan y PD123319, respectivamente) (figura 25D).

En conjunto, estos datos sugieren que en células de músculo liso vascular, mesangiales glomerulares y mononucleares, la AngII activa NF- κ B a través de ambos receptores AT₁ y AT₂, en nuestras condiciones de cultivo.

3.1.1 *Papel del receptor AT₂ en la activación de NF- κ B. Estudio en células deficientes del receptor AT₁.*

Para confirmar el papel del receptor AT₂ en la activación del NF- κ B se emplearon cultivos primarios de células mesangiales y vasculares provenientes de ratones deficientes del gen del receptor AT_{1a} (AT₁(-/-)). Existen dos isoformas del receptor AT₁ (AT_{1a} y AT_{1b}) que son codificadas por dos genes diferentes en ratón y rata. Sin embargo, en riñón y vaso, así como en células mesangiales y vasculares, la isoforma AT_{1a} es la predominante [190]. En células mesangiales AT₁(-/-) evaluamos en primer lugar la existencia de los receptores AT₂. En estado de reposo celular realizamos ensayos de RT-PCR y Western blot, detectando la banda correspondiente al AT₂ (figura 26). Además, como control de las células AT₁(-/-) realizamos ensayos de RT-PCR no observando banda para el receptor AT₁ (no mostrado).

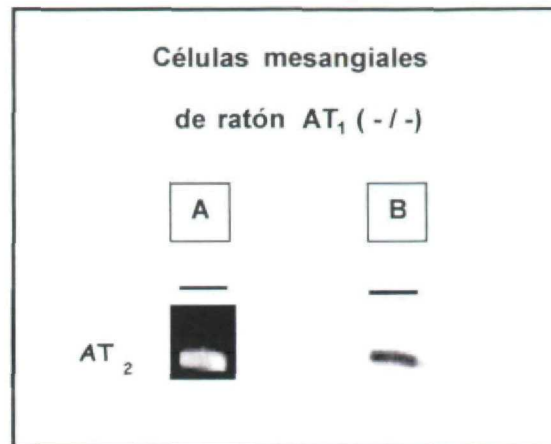


Figura 26. Determinación de los receptores AT₂ en células mesangiales AT₁(-/-). (A) Extractos de RNA de células deficientes del AT₁ fueron analizados por RT-PCR. (B) Extractos de proteínas totales de células AT₁ (-/-) fueron estudiadas por Western con un anticuerpo específico para el receptor AT₂. En ambas figuras se indica la posición de la banda correspondiente al receptor AT₂, demostrando la presencia de este receptor en células mesangiales.

Una vez que estudiamos la expresión y síntesis del receptor AT₂ en células mesangiales AT₁ (-/-), evaluamos el papel de este receptor en la patogenia del daño tisular, analizando su involucración en el proceso de activación de NF-κB inducido por AngII. Las células vasculares AT₁ (-/-) en reposo fueron estimuladas con AngII (10⁻⁷ y 10⁻⁹ mol/l), desde 15 a 120 min. En estas células, la AngII activó el NF-κB pasados los 15 min, alcanzando valores máximos tras 60 min, y decreciendo a los 120 min de estimulación. La dosis más efectiva fue la de 10⁻⁷ mol/l (3.7 veces vs control, n=4, p<0.05), con una intensidad similar a la del TNF-α e IL-1β (figura 27A). En células vasculares de fenotipo salvaje, la AngII también aumentó los niveles de NF-κB con una cinética similar a las AT₁ (-/-), máxima a 10⁻⁷ mol/l, y tras 60 min de incubación (4.8 veces vs control, n=3, p<0.05) (figura 27B).

Además, para asegurarnos del receptor implicado en la ruta AngII-NF-κB en ratón, preincubamos 60 min las células vasculares de fenotipo salvaje con antagonistas de los receptores AT₁ y AT₂ (Losartan y PD123319, respectivamente), y luego estimulamos con AngII (10⁻⁷ mol/l) durante 60 min. Al igual que sucedía en células vasculares de rata, ambos antagonistas disminuyeron parcialmente la activación de NF-κB inducido por AngII (figura 27B). Similares resultados fueron observados en células mesangiales de ratones de fenotipo salvaje y AT₁(-/-), salvo que en este caso la máxima activación de NF-κB ocurrió pasados los 30 min de estimulación de AngII (datos no mostrados).

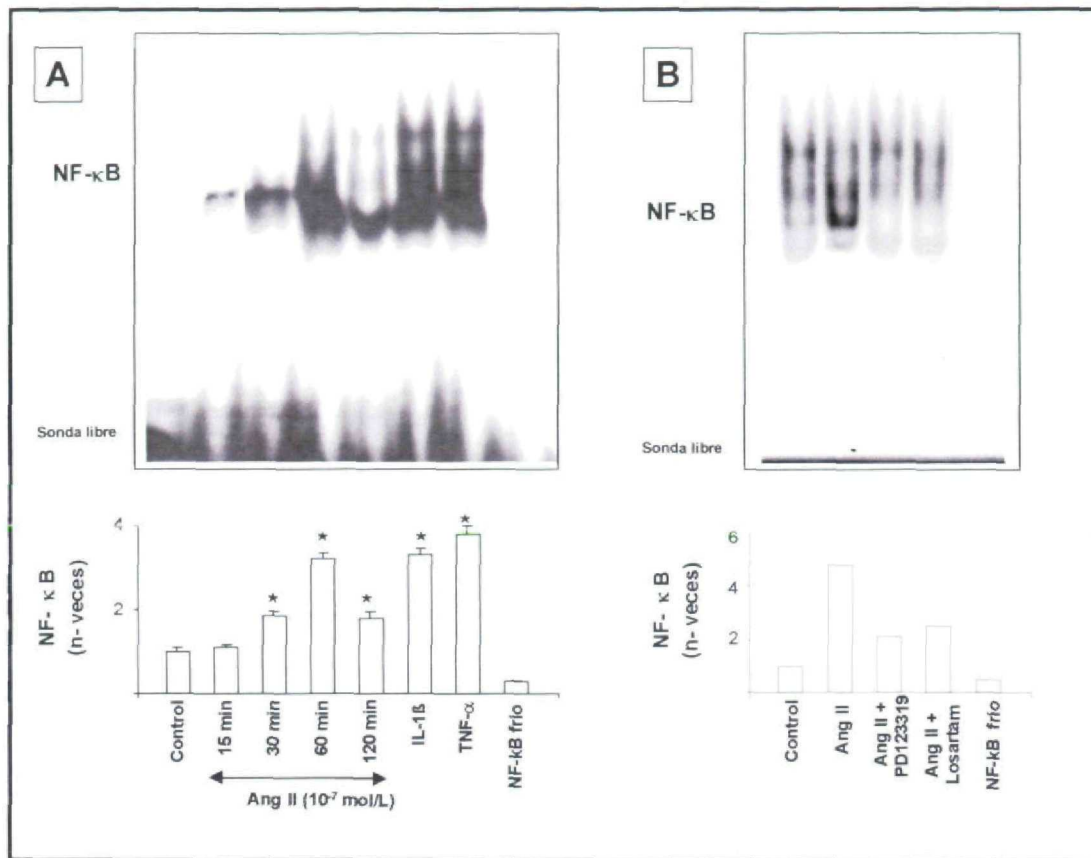


Figura 27. Activación de NF-κB inducido por AngII en células vasculares de ratón. (A) Las células vasculares AT₁(-/-) fueron incubadas con AngII (10⁻⁷ mol/l) desde 15 a 120 min. Como control positivo se utilizaron las citoquinas TNF-α e IL-1β (100 U/mL), y como control negativo, oligo NF-κB sin marcar. (B) Las células vasculares obtenidas de ratones de fenotipo salvaje fueron incubadas con AngII o previamente tratadas además 60 min con los antagonistas de los receptores AT₁ y AT₂. En todos los casos se aislaron las fracciones nucleares para ser analizadas por EMSA. En la parte superior de la figura se muestra un EMSA representativo de 3 realizados, y en la parte inferior, el análisis densitométrico de la media de los ensayos.

Estos resultados sugieren que la activación de NF-κB por AngII está mediada por ambos receptores AT₁ y AT₂, en células vasculares y mesangiales de rata y ratón. Comparando los resultados de células AT₁(-/-) y fenotipo salvaje observamos como se produce un mayor aumento de activación del NF-κB en las de fenotipo salvaje, por lo que podemos deducir que aunque el receptor AT₁ es el principal en la activación del factor NF-κB inducido por AngII, el AT₂ también juega un papel activo en este proceso. Nuevamente demostramos la presencia de los receptores AT₂ en células mesangiales y vasculares, así como su importancia en procesos de activación de factores de transcripción (NF-κB) inducidos por AngII.

4. Estudio de los mecanismos moleculares asociados a la activación del NF- κ B inducido por la AngII en células vasculares:

Con el objetivo de conocer los mecanismos de señalización intracelulares implicados en la activación de NF- κ B inducido por AngII, estudiamos la composición del complejo de NF- κ B activado, el papel de la subunidad inhibitoria del NF- κ B y los segundos mensajeros (radicales de oxígeno, tirosin-quinasa, ceramidas) que intervienen en el proceso de activación en células vasculares:

4.1 La AngII induce la translocación del heterodímero p50/p65 al núcleo.

El factor NF- κ B está compuesto por una serie de proteínas pertenecientes a la familia Rel (subunidades p50, p65, c-rel), específicas para cada tipo celular y que son capaces de unirse a otras proteínas denominadas I κ B [144,192]. Para determinar la composición del complejo NF- κ B activado por AngII en células vasculares, realizamos ensayos de super-retardo, inmunofluorescencia y Western blot utilizando anticuerpos específicos frente a las subunidades.

Para los ensayos de super-retardo se utilizaron extractos nucleares obtenidos a partir de células vasculares tratadas con 10^{-9} mol/L AngII durante 1h (máxima activación de NF- κ B en células vasculares). El ensayo de unión se realizó mediante la preincubación con los anticuerpos frente a las subunidades del NF- κ B; p50, p65 y c-Rel, analizando los complejos mediante electroforesis (ver métodos). La presencia de los anticuerpos anti-p50 y anti-p65 permitió observar una banda de superretardo para cada anticuerpo (figura 28). Sin embargo, no hubo ningún efecto con el anticuerpo anti-c-Rel.

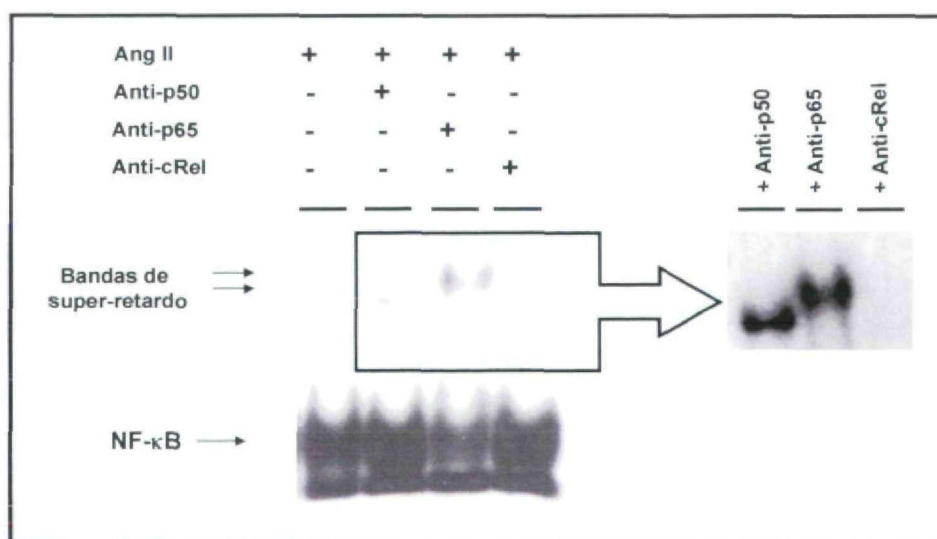


FIGURA 28. Caracterización de los complejos de NF- κ B inducidos por AngII. Los extractos nucleares de células vasculares tratadas con AngII (1h a 10^{-9} mol/L) fueron preincubados con anticuerpos frente a las subunidades de NF- κ B; p50, p65 y c-Rel, y posterior análisis por EMSA. Las bandas de superretardo se observaron sólo con anticuerpos anti-p50 y anti-p65. A la derecha se muestra una mayor exposición del gel. La posición de los complejos de NF- κ B y del oligonucleótido libre, está indicada. La figura muestra un EMSA representativo de cinco realizados.

Mediante inmunohistoquímica estudiamos la localización intracelular de las subunidades p50 y p65. En células vasculares en estado de reposo, la tinción para ambos anticuerpos se localizó en el citosol. En respuesta a la estimulación durante 1h con 10^{-9} mol/L AngII se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia nuclear, correspondiendo a la translocación de ambas subunidades p50 y p65 al núcleo (figura 29).

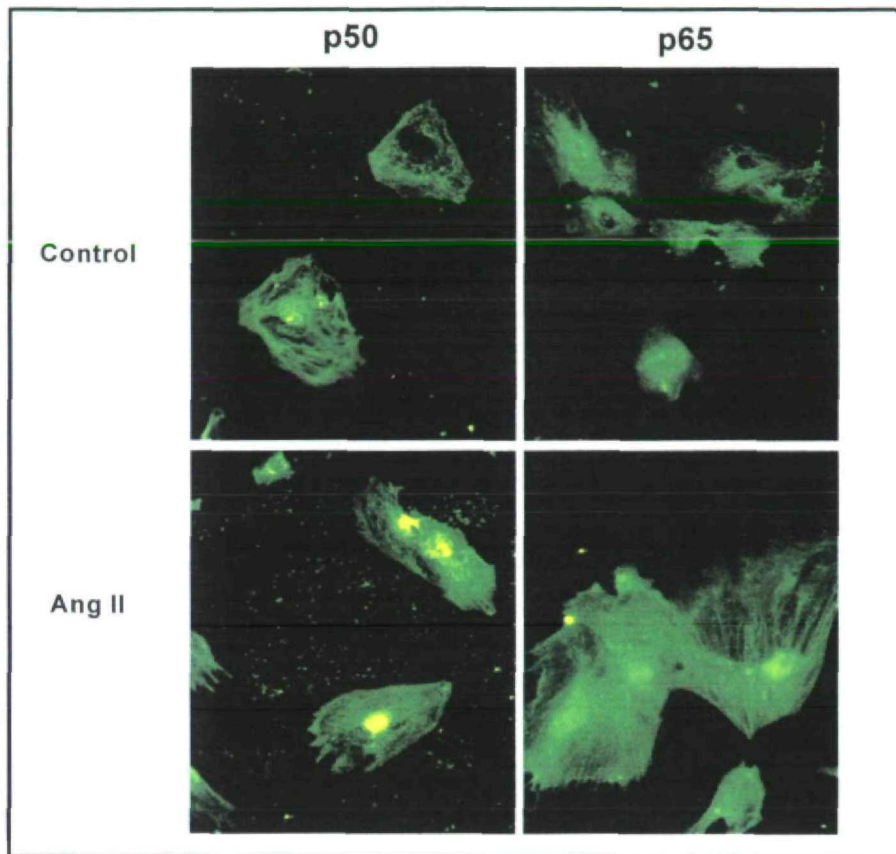


FIGURA 29. Localización de las subunidades de NF- κ B. En células vasculares control se detectó un marcaje citosólico difuso con los anticuerpos anti-p50 y anti-p65. Cuando las células fueron tratadas con AngII (10^{-9} mol/L) durante una hora, se observó una intensa fluorescencia nuclear para ambos anticuerpos, indicando la translocación de las subunidades p50 y p65 al núcleo.

Además estudiamos la composición del NF- κ B activado mediante Western blot de los extractos nucleares. En células vasculares estimuladas con AngII existió un aumento en los niveles nucleares de p50, máximo a la dosis de 10^{-9} mol/L y a los 60 min (3-veces, $n=3$, $p<0.05$) (figura 30). La subunidad p65 es la responsable de la capacidad transcripcional del NF- κ B [143]. En las células en fase de reposo, los niveles de p65 en los extractos nucleares son apenas detectables. La estimulación con AngII (10^{-9} mol/L) durante 1h incrementó la intensidad de la banda correspondiente a 65 kDa, lo que sugiere un aumento de la subunidad p65 nuclear (8-veces, $n=3$, $p<0.05$) (figura 30).

En otros puntos del experimento observamos como la estimulación con el agonista del receptor AT_2 , pNH_2FAII , (10^{-9} mol/L) durante 60 min aumentó los niveles nucleares de p50 y p65, máximo a 10^{-9} mol/L y con una intensidad similar a la AngII (2- y 5-veces, respectivamente, $n=3$, $p<0.05$) (figura 30). Similares resultados fueron obtenidos en células mesangiales en cultivo (datos no mostrados).

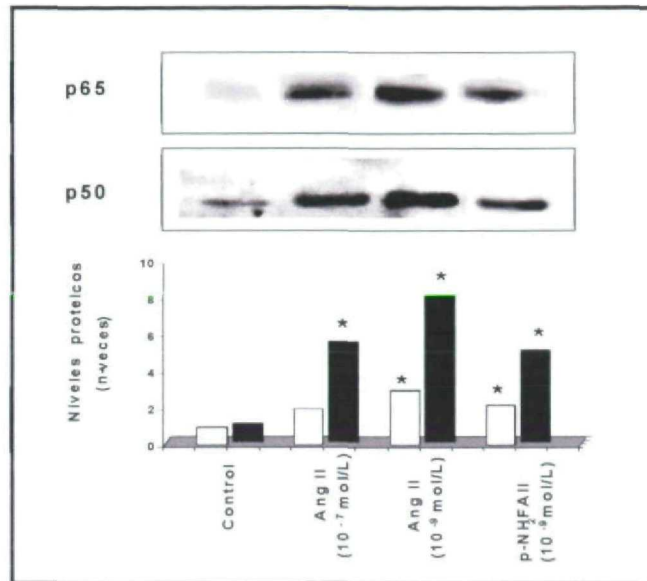


FIGURA 30. Niveles nucleares de p50 y p65. Las células vasculares fueron incubadas con AngII (10^{-7} o 10^{-9} mol/L) y pNH_2FAII (10^{-9} mol/L) durante 60 min. Los extractos nucleares fueron aislados y analizados por Western blot. En la parte superior de la figura, se muestra un experimento representativo de tres con comparables resultados, y en la inferior, el análisis densitométrico de la media, * $p<0.05$ vs control. Las barras blancas y negras representan p50 y p65, respectivamente.

En resumen, en células vasculares y mesangiales la estimulación con AngII induce la translocación al núcleo del complejo de NF- κ B formado por las subunidades p50 y p65, a través de ambos receptores AT_1 y AT_2 .

4.2 La AngII induce la degradación de la subunidad inhibitoria I κ B citosólica

La activación del NF- κ B ocurre tras la disociación citosólica de la subunidad I κ B del complejo p50/p65, al ser fosforilado en un residuo de serina [191,192] y posteriormente degradarse por las enzimas del proteosoma. Para correlacionar los niveles de degradación de I κ B con los de activación de NF- κ B, evaluamos el efecto de la estimulación de AngII en los niveles citosólicos de I κ B (I κ B α e I κ B β) en células vasculares.

Las células vasculares fueron incubadas con 10^{-9} mol/L AngII desde 30 min hasta 2h, se aislaron las fracciones citosólicas y se analizó la proteína I κ B α por Western blot. En células sin estimular, observamos una banda de alrededor de 39 KDa correspondiente al peso molecular del I κ B α . Como podemos ver en la figura 31A, la AngII provocó la desaparición de esta banda de forma rápida y transitoria, máxima al cabo de 1h, lo que sugiere una degradación del I κ B α citosólico. Este efecto se correlacionó con la máxima activación del NF- κ B y con la translocación de las subunidades p50 y p65 al núcleo. Al cabo de 2h se observó una reaparición de la banda, indicando una resíntesis de I κ B α . La subunidad I κ B β se localizó con un peso de alrededor de 41 KDa, pero sin embargo, la AngII no modificó en estas células sus niveles citosólicos a los tiempos estudiados (figura 31A). En otros ensayos, cuando las células fueron pretratadas con los antagonistas AT $_1$ o AT $_2$ se observó una inhibición de la degradación del I κ B α inducida por AngII, lo que sugiere que ambos receptores participan en este proceso (figura 31B). Ni Losartan ni PD123319 tuvieron efecto en células control.

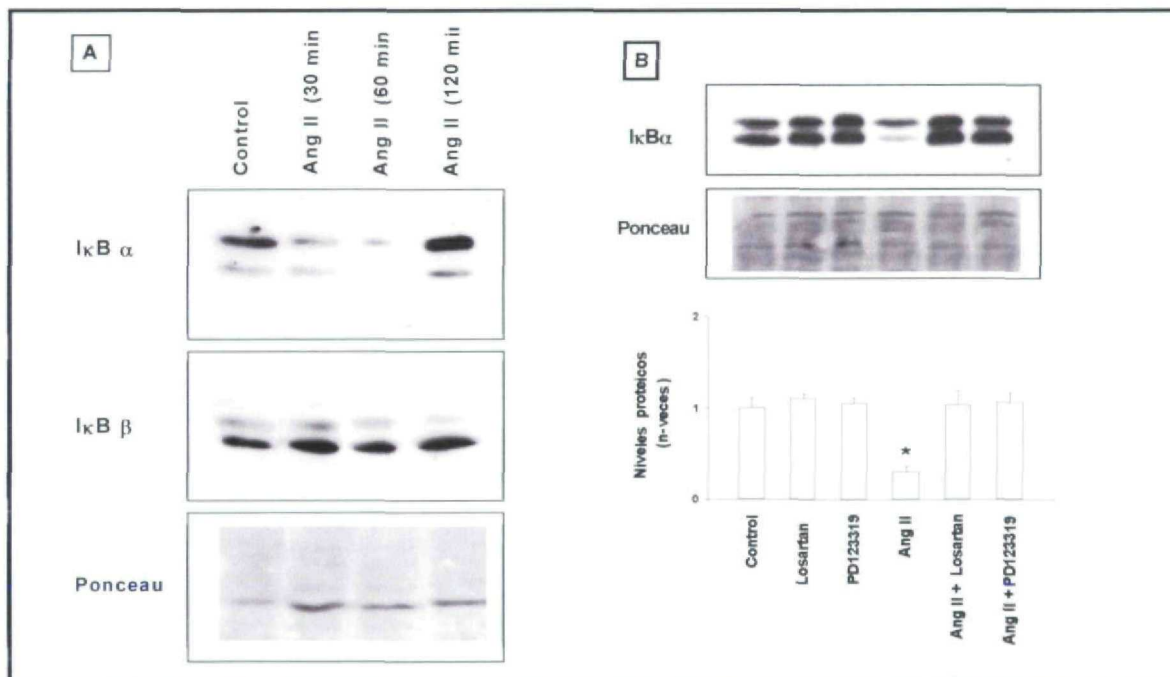


FIGURA 31 . (A) Efecto de la AngII en los niveles citosólicos de I κ B (α y β). Las células vasculares fueron tratadas con AngII 10^{-9} mol/L durante diferentes tiempos. En el caso de I κ B α (39 kDa), se observó una rápida degradación seguida de resíntesis, mientras que para I κ B β (peso aparente de 41 Kda) no se detectó modificación alguna, con respecto a los niveles proteicos basales. Los extractos citosólicos fueron separados por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, incubados con anticuerpos anti-I κ B α o anti-I κ B β y visualizados por quimioluminiscencia (Western). La tinción con S. Ponceau muestra igual carga y transferencia de las muestras. Los resultados son representativos de tres experimentos realizados. **(B) Papel de los receptores AT $_1$ y AT $_2$ en los niveles de I κ B α** Las células vasculares fueron preincubadas durante 60 min con Losartan (10^{-6} mol/L) o PD123319 (10^{-5} mol/L), y posteriormente estimuladas con AngII 10^{-9} mol/L durante 60 min. En otros puntos del ensayo, las células se incubaron sólo con Losartan y PD123319. En el panel superior la figura se muestra un experimento de Western representativo de cuatro realizados, y en el panel inferior, se muestran los valores de las medias \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control.

4.2.1 Estudio de los niveles de $I\kappa B\alpha$ en células de ratón AT_1 (-/-). Papel del AT_2 .

Con el fin de conocer la participación exacta del AT_2 en la degradación de $I\kappa B$, realizamos experimentos en células de ratones AT_1 (-/-). Las células se estimularon durante 30, 60 y 120 min con AngII (10^{-9} mol/L). Además, en otros experimentos se pretrataron las células con el antagonista del receptor AT_2 , PD123319. Transcurridos todos los tiempos de incubación se aislaron las fracciones citosólicas para analizarlas por Western blot y evaluar los niveles de $I\kappa B\alpha$ con un anticuerpo específico frente a esta subunidad.

La AngII, pasados 30 min de la estimulación, provocó también una rápida degradación de $I\kappa B\alpha$ citosólico, correlacionándose con el máximo aumento de actividad de NF- κB en células mesangiales. Después de una hora, se recobraron los niveles basales de $I\kappa B\alpha$, indicando la resíntesis de la subunidad. Además, el pretratamiento con el antagonista del AT_2 , PD123319, inhibió la degradación de $I\kappa B\alpha$ inducido por AngII tras 30 min de incubación (figura 32).

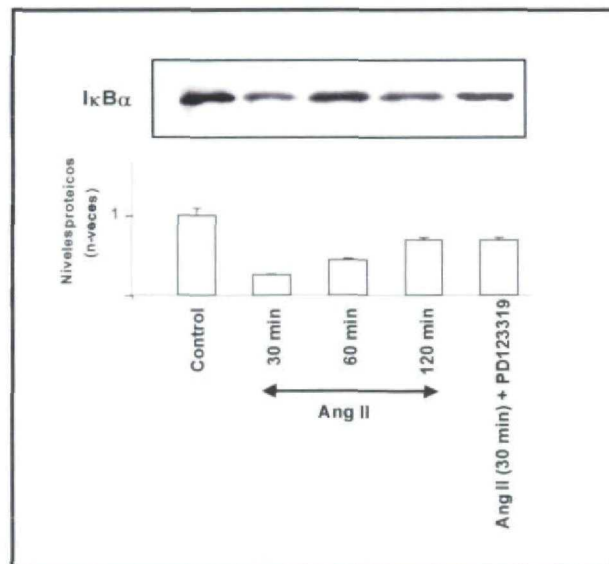


Figura 32. Regulación de $I\kappa B\alpha$ por AngII en células deficientes del receptor AT_1 . Las células mesangiales AT_1 (-/-) fueron estimuladas con AngII (10^{-9} mol/L) desde 30 hasta 120 min. En otros puntos, las células se pretrataron con el antagonista del receptor AT_2 (PD123319, 60 min), y posteriormente se incubaron con AngII durante 30 min adicionales. En todos los casos se aislaron las fracciones citosólicas y se analizaron por Western blot frente a un anticuerpo específico de $I\kappa B\alpha$. En la figura podemos observar en la parte superior un Western representativo de 3 realizados, y en la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la media de los experimentos.

Resultados similares observamos en células vasculares AT_1 (-/-), donde la degradación de $I\kappa B\alpha$ comenzó tras 60 min de estimulación y el PD123319 también inhibió esta degradación (datos no mostrados). Estos datos ratifican que en células mesangiales y vasculares, además del receptor AT_1 , el AT_2 participa activamente en la degradación de $I\kappa B\alpha$ (y en la activación de NF- κB) inducido por AngII.

4.3 Mediadores implicados en la ruta AngII/NF- κ B. Divergencia entre los receptores AT₁ y AT₂.

Con el fin de discernir entre los diferentes mecanismos intracelulares de activación de NF- κ B inducido por AngII a través de los dos receptores AT₁ y AT₂, investigamos el papel de diversas proteína quinasas y fosfatasa, radicales de oxígeno y ceramidas, posiblemente implicados en estos procesos.

4.3.1 Papel de la Proteína Kinasa C (PKC):

Entre los mecanismos de regulación de NF- κ B se ha implicado a la proteína quinasa C (PKC) [187]. Se ha demostrado previamente que la AngII, a través de los receptores AT₁ activa diferentes quinasas, incluida la PKC y la fosfotirosina quinasa (PTK) [28,29,35,193].

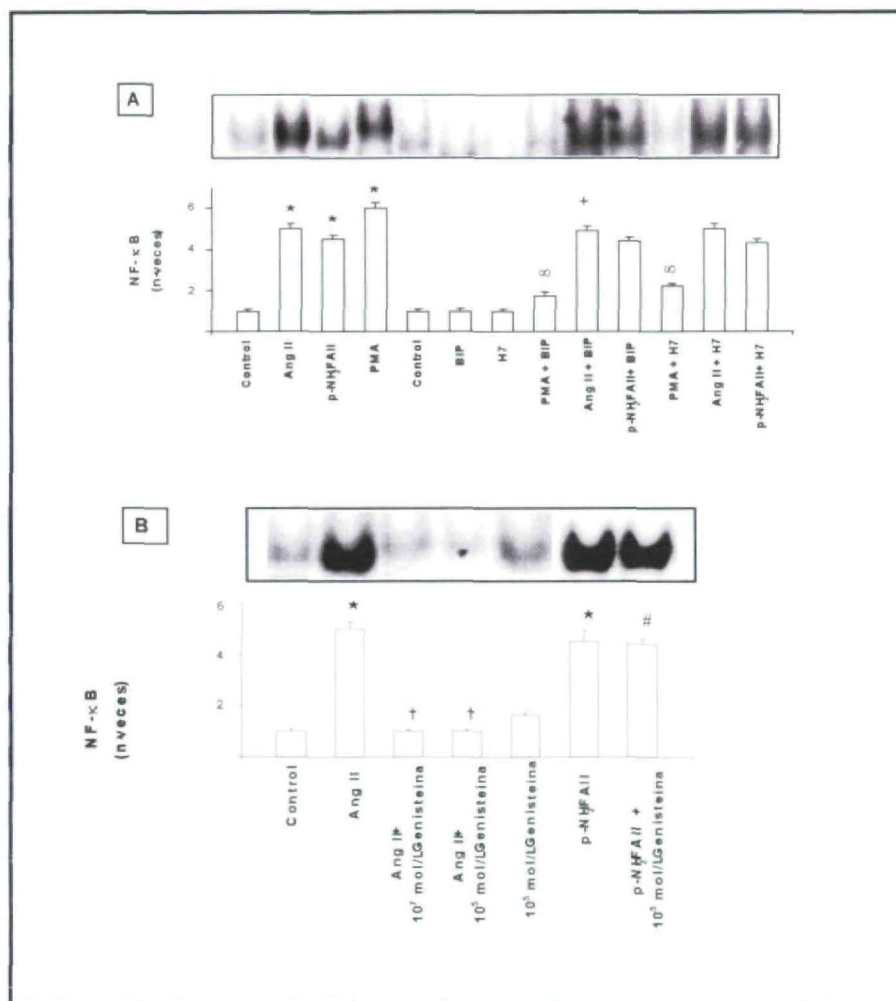


FIGURA 33. Mecanismos moleculares de la activación de NF- κ B inducida por AngII. Las células vasculares fueron preincubadas durante una hora con distintos inhibidores y después estimuladas con 10⁻⁹ mol/L AngII o pNH₂FAII durante una hora: (A) Inhibidores de la PKC: H-7 (10⁻⁵ mol/L) y BIP (10⁻⁷ mol/L). El PMA (10⁻⁷ mol/L) se utilizó como control positivo de la PKC. (B) Inhibidores de la PTK: genisteína (10⁻⁵-10⁻⁷ mol/L). En la parte superior se muestra un gel representativo y en la inferior, el análisis de la media \pm EEM. *p<0.05 vs control; \approx p<0.05 vs PMA; [†]p<0.05 vs AngII; [#]p<0.05 vs pNH₂FAII.

El papel de la PKC sobre el NF- κ B parece ser dependiente del tipo celular o estímulo estudiado, ya que participa en la acción del H₂O₂ en células endoteliales [187], pero no tiene efecto por ejemplo con el TNF- α y la IL-1 β [194]. En nuestros ensayos, preincubamos las células vasculares durante 1h con dos inhibidores específicos de la PKC; H-7 (10⁻⁵ mol/L) y bisindolilmaleimida (BIP) (10⁻⁷ mol/L), y posteriormente las estimulamos durante 1h con 10⁻⁹ mol/L AngII o pNH₂FAII (agonista del receptor AT₂). Ni H7 ni BIP afectaron a la activación del NF- κ B inducida por estos péptidos (figura 33A), sugiriendo que en células vasculares, la AngII activa este factor de transcripción por un mecanismo independiente de la PKC. Como control del experimento se evaluó el efecto de estos inhibidores (H7 y BIP) sobre un conocido inductor de la activación de la PKC, el éster de forbol PMA. Como muestra la figura 33A, la activación del NF- κ B inducida por el PMA fue bloqueada por ambos inhibidores. El tratamiento de H7 y BIP solos en células control no provocó efecto alguno.

4.3.2 *Papel de las Proteínas Tirosina-quinasas (PTK):*

Por otro lado, las células vasculares fueron preincubadas con varios inhibidores de la PTK (genisteína, erbstatina y herbimicina A). La genisteína inhibió la activación del NF- κ B inducida por la AngII (95% inhibición vs AngII, n=4, p<0.05) (figura 33B), y no tuvo ningún efecto en células control. Resultados similares se observaron con los otros inhibidores de PTK (no mostrados). Por el contrario, los inhibidores de la PTK no tuvieron efecto en la activación del NF- κ B inducida por el agonista AT₂ (pNH₂FAII). Estos resultados sugieren que la activación de fosfotirosina quinasas podría estar implicada en la respuesta de NF- κ B vía AT₁, y no a través del AT₂.

4.3.3 *Papel de los antioxidantes:*

Un mecanismo potencial de la activación del NF- κ B es la reducción del estrés oxidativo [195]. En células vasculares hemos observado que la preincubación (1 hora) con dos antioxidantes, superoxidodismutasa (SOD) (10 g/L) y catalasa (rango 0.1-1.0 g/L), abolió la activación del NF- κ B inducida por AngII y por pNH₂FAII (figura 34A). Ninguno de los antioxidantes provocó efecto en células control. Estos datos sugieren la posible participación de radicales de oxígeno en la activación de NF- κ B inducido por AngII, tanto a través de AT₁ como por AT₂.

Además, en varias líneas celulares se ha demostrado que el antioxidante pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) bloquea la activación de NF- κ B inducida por citoquinas y ésteres de forbol [174,175,196]. En células vasculares hemos observado que la preincubación con PDTC (10⁻⁴ mol/L) durante 1h abolió la activación del NF- κ B inducida por AngII o pNH₂FAII. Resultados similares fueron observados para otro inhibidor del NF- κ B, el MG132, el cual inhibe la degradación de la subunidad I κ B por el proteosoma (figura 34B). Ni PDTC ni MG132 (10⁻⁵ mol/L) afectaron a las células control en este proceso.

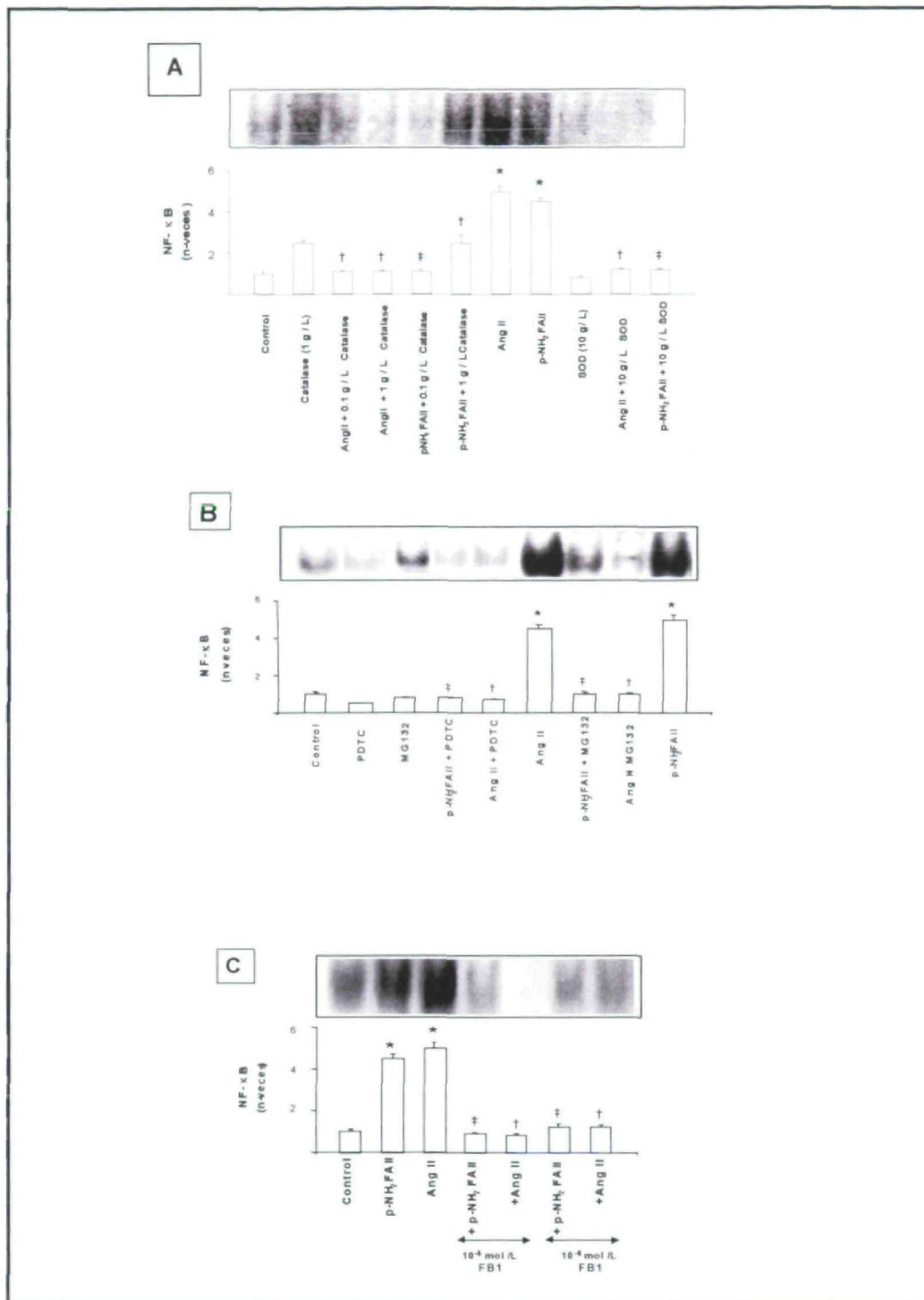


Figura 34. (A) Efecto en la activación de NF-κB del tratamiento con antioxidantes: SOD (10 g/L) y catalasa (0.1 to 1 g/L). (B) Inhibidores de NF-κB: PDTc (10⁻⁴ mol/L) y MG132 (10⁻⁵ mol/L). (C) Inhibidor de la producción de ceramidas: FB₁ (10⁻⁵ -10⁻⁶ mol/L). En todos los caso se pretrató 60 min, y se estimuló posteriormente con AngII o pNH₂FAII (10⁻⁷ mol/L) una hora. Las figuras muestran un EMSA representativo de tres realizados. Los valores de las medias ± EEM obtenidos por análisis densitométrico se muestran en los paneles inferiores. *p<0.05 vs control; †p<0.05 vs AngII; ‡p<0.05 vs pNH₂FAII.

4.3.4 *Papel de las Proteínas Fosfatasas (PP2A):*

Se ha demostrado que el receptor AT_2 está asociado a la activación de fosfotirosina fosfatasa-2A (PP2A), [28], por lo que también intentamos evaluar el papel de la PP2A en este proceso. Sin embargo, el tratamiento de células vasculares con ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasas, activó el NF- κ B (datos no mostrados), como se ha descrito en otras células [197], por lo que no podemos profundizar en el conocimiento de estos segundos mensajeros.

4.3.5 *Papel de las Ceramidas:*

Finalmente, otro posible mecanismo de señalización en la activación del NF- κ B implica la producción de ceramidas [193]. Previamente se ha demostrado que la activación del receptor AT_2 provocó la síntesis de ceramidas. En nuestros ensayos, *pretratamos* las células vasculares durante 1h con fumonisina B_1 (FB_1 : 10^{-5} - 10^{-6} mol/L), un inhibidor de la síntesis de ceramidas. Después fueron incubadas con AngII o pNH_2FAII (10^{-7} mol/L) durante una hora. Como podemos ver en la figura 34C, la FB_1 inhibió la activación del NF- κ B inducida por AngII y pNH_2FAII , sugiriendo que las ceramidas podrían ser principalmente mediadores de la acción de la AngII a través del AT_2 en la activación de NF- κ B.

5. Efecto de la AngII en la transcripción génica mediada por NF- κ B.

A continuación evaluamos si el aumento de la activación de NF- κ B por AngII, se traducía posteriormente en sobreexpresión de genes involucrados en el daño tisular. Además, para investigar el tipo de receptor de AngII, AT_1 y/o AT_2 , que media la expresión génica regulada por NF- κ B, se realizaron dos estrategias diferentes: transfecciones transitorias con un plásmido reportero, que contiene en su promotor sitios de unión para el NF- κ B, y análisis de la expresión de genes regulados por el NF- κ B que contienen sitios de unión para el este factor en sus secuencias promotoras.

5.1 *Transcripción génica dependiente de NF- κ B; Ensayos de Transfección:*

Inicialmente determinamos si el aumento de los niveles de NF- κ B nuclear por AngII se correspondían con un incremento de la actividad transcripcional dependiente de NF- κ B. Con el fin de conocer si la AngII podría aumentar la actividad transcripcional de genes bajo el control del promotor NF- κ B, empleamos un plásmido que contiene cinco copias de la secuencia de unión al NF- κ B en su promotor asociado a luciferasa (NF- κ B/luc). Las células vasculares quiescentes se cotransfectaron con NF- κ B/luc y TK-renila (control interno), mediante transfección génica por el método balístico [58]. Posteriormente, se mantuvieron en un medio sin suero durante 24h, se estimularon con AngII, pNH_2FAII (10^{-7} mol/L) o PMA (10^{-7} mol/L, como control positivo) durante otras 24h y se midió la actividad luciferasa.

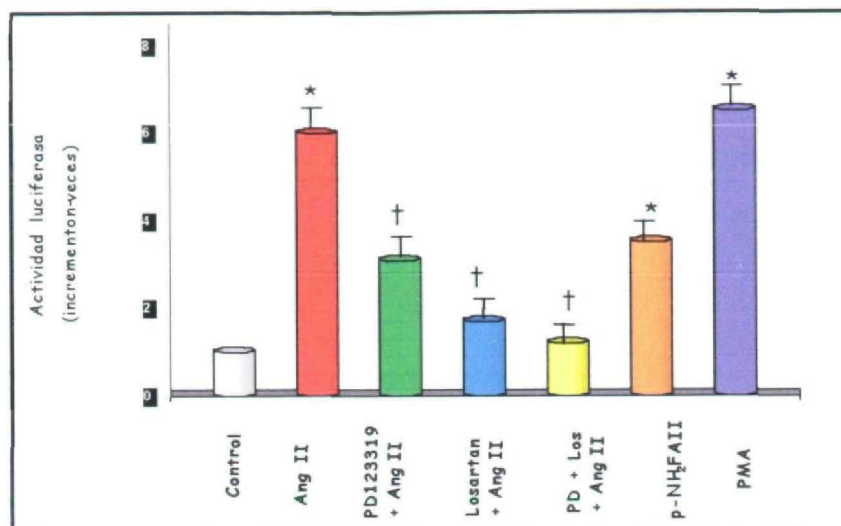


FIGURA 35. Ensayo de Transfección para NF- κ B en células vasculares. Las células quiescentes se transfectaron con el gen reportero NF- κ B/luc, se mantuvieron en medio sin suero (24h) y se estimularon con AngII, PMA o pNH₂FAII (10^{-7} mol/L) durante 24h. En algunos puntos, las células se preincubaron con Losartan y/o PD123319 (10^{-5} mol/L). Los datos están expresados como incrementos de n-veces vs control y corregidos por los valores de renilla. La figura muestra las medias \pm EEM de cuatro ensayos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control; † $p < 0.05$ vs AngII.

La AngII incrementó la expresión del plásmido NF- κ B/luc (6-veces vs control, $n=5$, $p < 0.05$) con una respuesta similar al PMA. No se observó actividad en el plásmido control (no mostrado). El agonista AT₂, pNH₂FAII, también aumentó la actividad luciferasa (3.7-veces, $p < 0.05$; figura 35). Cuando las células fueron pretratadas con los antagonistas AT₁ o AT₂ (Losartan o PD123319, respectivamente) se observó una disminución parcial en el efecto inducido por la AngII en la transcripción mediada por NF- κ B, que fue total cuando ambos antagonistas se añadieron juntos (figura 35; 95% inhibición vs AngII sola, $n=4$, $p < 0.05$). Interesantemente, el efecto inhibitorio del antagonista AT₁ fue mayor que el del AT₂, lo que sugiere que aunque la AngII aumenta la transcripción dependiente de NF- κ B a través de los receptores AT₁ o AT₂, la ruta AT₁/NF- κ B parece ser más activa.

5.2 Análisis de la expresión génica por Northern blot y RT-PCR:

Con el objetivo de desvelar el papel de los receptores de AngII en la regulación de genes controlados por NF- κ B, estudiamos en células vasculares el efecto de la AngII en la expresión génica de MCP-1 (por Northern blot), y Angiotensinógeno (por RT-PCR).

5.2.1 Efecto de la AngII en la expresión de MCP-1. Mecanismos y receptores implicados:

Las células vasculares se incubaron con AngII (6h), se aisló el RNA celular para separarlo electroforéticamente y se transfirió a membranas, las cuales se hibridaron con una sonda de MCP-1 de rata o con GAPDH. Las células vasculares quiescentes presentaron niveles basales de expresión de MCP-1 con un peso de 0.8 Kb. Sin

embargo, la estimulación con AngII aumentó los niveles del mRNA de MCP-1 a las 6h (10^{-7} mol/L; 5-veces vs control, $n=5$, $p<0.05$), como se había demostrado previamente [70]. El pretratamiento de las células vasculares con el antagonista AT_1 (Losartan) causó una disminución significativa de la expresión de MCP-1 inducida por AngII, mientras que el antagonista AT_2 (PD123319) provocó sólo una ligera reducción (78% y 26% vs AngII sola, respectivamente). El agonista AT_2 (pNH₂FAII) también aumentó el mRNA de MCP-1, pero en menor medida que la AngII (2.1 veces vs control) (figura 36B). Estos datos sugieren que la inducción de la expresión de MCP-1 por AngII se produce principalmente vía AT_1 . El factor de transcripción NF- κ B está involucrado en la activación de la expresión del MCP-1 inducido por IL-1 β , TNF α y ésteres de forbol [70,71,192]. Como ya hemos visto anteriormente, un mecanismo potencial de inhibición de la activación de NF- κ B es mediante el bloqueo de la degradación del proteosoma, o a través de la reducción por estrés oxidativo. El pretratamiento con inhibidores de la activación de NF- κ B como el MG132 (figura 36B) y el PDTC (no mostrado), disminuyen la sobreexpresión de MCP-1 inducida por AngII, y en menor medida por el pNH₂FAII. Estos datos demuestran que el aumento de la expresión de MCP-1 (principalmente a través del AT_1) por AngII, está mediado por la activación de NF- κ B.

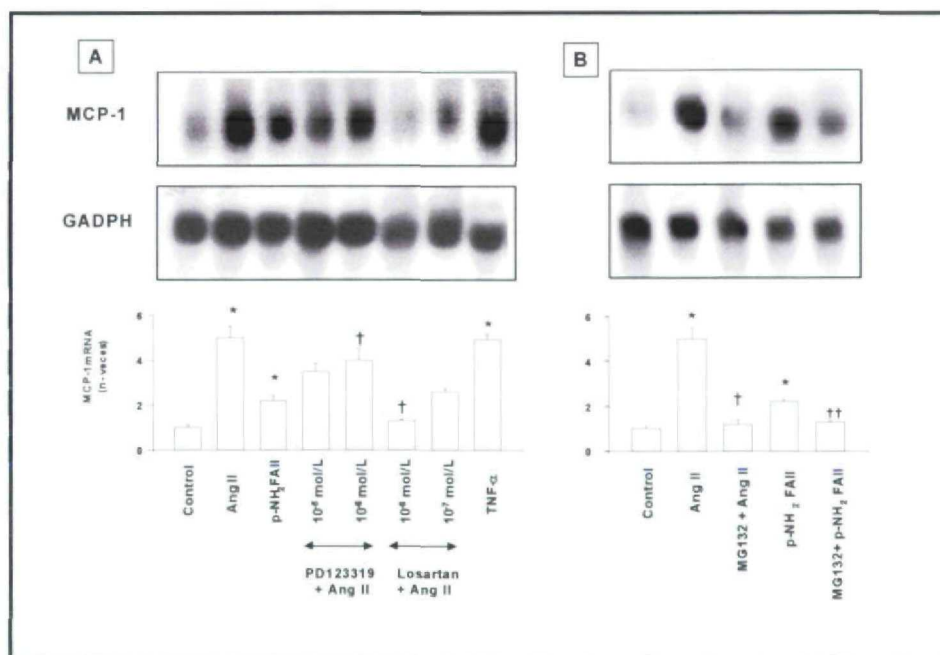


Figura 36. (A) La AngII induce la expresión de MCP-1 vía AT_1 en células vasculares. Las células quiescentes fueron tratadas con AngII (10^{-7} mol/L) o con el agonista del receptor AT_2 (pNH₂FAII) durante 6h. En otros ensayos, las células fueron pretratadas durante 60 min con Losartan o PD123319, y posteriormente estimuladas con AngII 10^{-7} mol/L durante 6h. El TNF- α (100 U/mL) fue utilizado como control positivo. (B) Papel del NF κ B en la sobreexpresión de MCP-1 inducida por AngII. Efecto del pretratamiento con el inhibidor de NF- κ B (MG132; 10^{-5} mol/L) en la expresión del mRNA del MCP-1 inducido por AngII o por pNH₂FAII. Después de todos los tratamientos, se aisló el RNA celular y la expresión de MCP-1 (panel superior) y de su correspondiente control interno, la GADPH (medio), fue determinada por Northern blot. Los valores de las medias \pm EEM obtenidos por análisis densitométrico se muestran en el panel inferior. * $p<0.05$ vs control; † $p<0.05$ vs AngII; †† $p<0.05$ vs pNH₂FAII.

5.2.2 Efecto de la AngII en la expresión de Angiotensinógeno (Ao):

Como se ha comentado en la Introducción, el Ao es el precursor del sistema SRA y mediante diversas degradaciones enzimáticas se transforma en AngII. Por RT-PCR hemos observado niveles basales de mRNA del Ao en células vasculares. Tras la incubación con AngII, estos niveles de Ao incrementaron, de forma máxima transcurridas 6 horas de incubación (7 veces vs control) (figura 37). Además, sólo el pretratamiento con el antagonista AT₁ (Losartan), disminuyó estos valores hasta niveles basales, por lo que podríamos deducir que la principal vía de sobreexpresión de Ao por AngII en células vasculares, se realiza también a través los receptores AT₁.

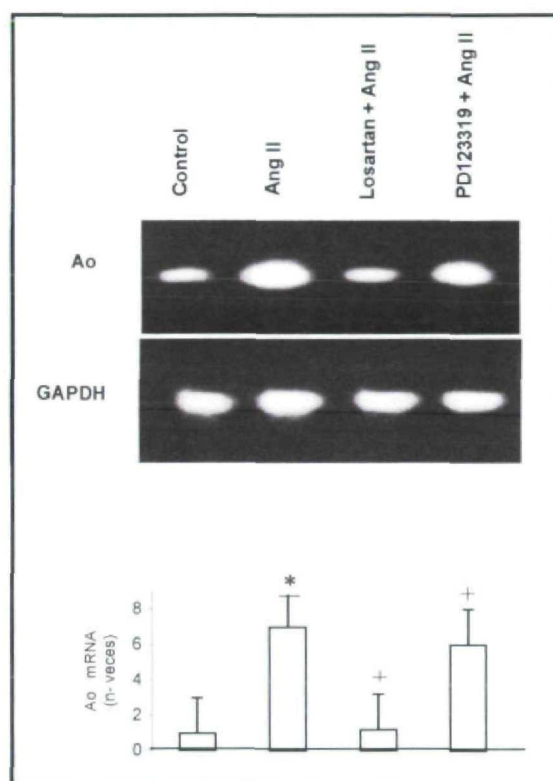


Figura 37. La AngII incrementó la expresión génica de Angiotensinógeno a través de los receptores AT₁. Las células vasculares expresaron constitutivamente mRNA del angiotensinógeno (Ao). Este gen aumentó su expresión por la incubación (6h) con AngII (10^{-7} mol/L), como se muestra por RT-PCR. En otros puntos del experimento, las células fueron pre-estimuladas durante 60 min con Losartan o PD123319, y posteriormente con AngII 10^{-7} mol/L. La figura muestra un experimento representativo de RT-PCR de dos realizados; la GAPDH fue utilizada como control interno. En la parte inferior podemos observar el análisis densitométrico de la media. * $p < 0.05$ vs control; + $p < 0.05$ vs AngII.

Podemos concluir que la AngII, principalmente vía receptores AT₁, es capaz de regular la expresión de genes importantes en el daño tisular. Muchos de ellos están ligados a la activación de NF- κ B, como el Ao y MCP-1.

- El segundo objetivo principal de esta Tesis ha sido estudiar si otros péptidos del SRA, como la AngIII, AngIV o Ang(1-7), son capaces de estimular la activación del factor NF- κ B, el cual hemos demostrado que es capaz de controlar la expresión de genes implicados en procesos de daño tisular. Algunas acciones atribuidas en un principio a la AngII, son debidas a la actividad de estos péptidos. Así, la liberación de aldosterona, depende de la conversión de AngII en AngIII, y la producción del PAI-1, recientemente se ha atribuido a la acción de la AngIV a través de un receptor específico y diferente de los AT₁ y AT₂ [31]. Por su parte la Ang(1-7) se postula que puede unir a otros receptores y provocar acciones beneficiosas que contrarestan las provocadas por los demás péptidos [32].

En células mononucleares, la activación de NF- κ B fue inducida por la incubación con los diferentes péptidos del SRA. Como podemos observar en la figura 38, todos los péptidos del SRA con actividad biológica (ver Introducción) estimularon la activación de NF- κ B (a la dosis de 10^{-7} mol/L y tras una hora de incubación). Similares resultados encontramos en células vasculares y mesangiales (datos no mostrados).

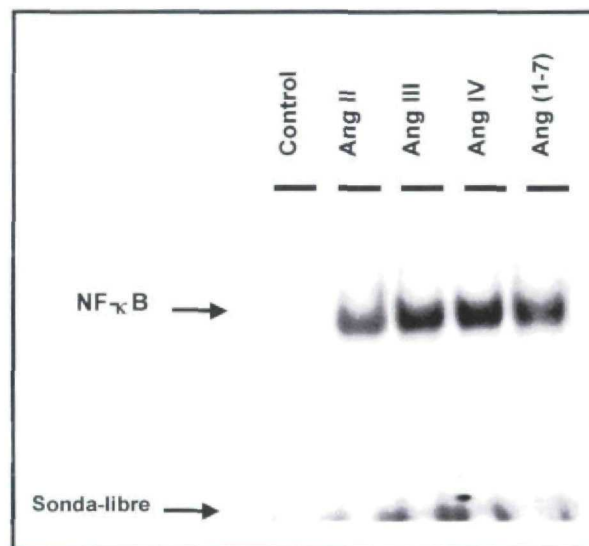


Figura 38. Activación de NF- κ B inducido por péptidos del SRA en células monocíticas. Otros péptidos del SRA además de la AngII son capaces de inducir la activación del factor NF- κ B; AngIII, AngIV y Ang(1-7); 10^{-7} mol/L.

ESTUDIO DEL PRODUCTO DE DEGRADACIÓN DEL SRA; LA ANG III, EN EL DAÑO RENAL:

De todos estos péptidos del SRA, elegimos a la AngIII debido a que se ha demostrado recientemente que puede poseer un importante papel en procesos de daño tisular, y es capaz de imitar las acciones de la AngII. Además, en situaciones de daño renal se ha demostrado un aumento de los niveles de AngII y de la actividad y expresión de la APA; enzima encargada de la degradación de AngII en AngIII [17,114]. Es posible por tanto encontrar niveles incrementados de AngIII en estos procesos.

Además, se ha observado que la AngIII está implicada en procesos de proteinuria durante el daño renal [198].

6. Efecto de la AngIII en células mesangiales.

Como hemos observado anteriormente, la AngIII activó NF- κ B de modo similar a la AngII, por lo que nuestro siguiente objetivo fue conocer los mecanismos implicados en esta activación, y si la AngIII controla la expresión y síntesis de determinados genes implicados en el daño renal.

6.1 Dosis-tiempo dependencia de la activación de NF- κ B inducida por AngIII. Papel de los receptores AT₁ y AT₂.

Las células mesangiales en reposo fueron incubadas con AngIII o AngII (10^{-7} - 10^{-9} mol/L) durante 30, 60 y 120 min. Transcurridos los tiempos de estimulación, obtuvimos los extractos nucleares para analizarlos por EMSA. Como se puede ver en la figura 39, la AngIII en células mesangiales induce un aumento de la activación de NF- κ B, con un máximo de activación a la dosis de 10^{-9} mol/L y tras una hora de incubación, de modo similar al efecto producido por la AngII (3.9- y 3.7-veces vs basal, AngIII y AngII respectivamente; n=6, p<0.05).

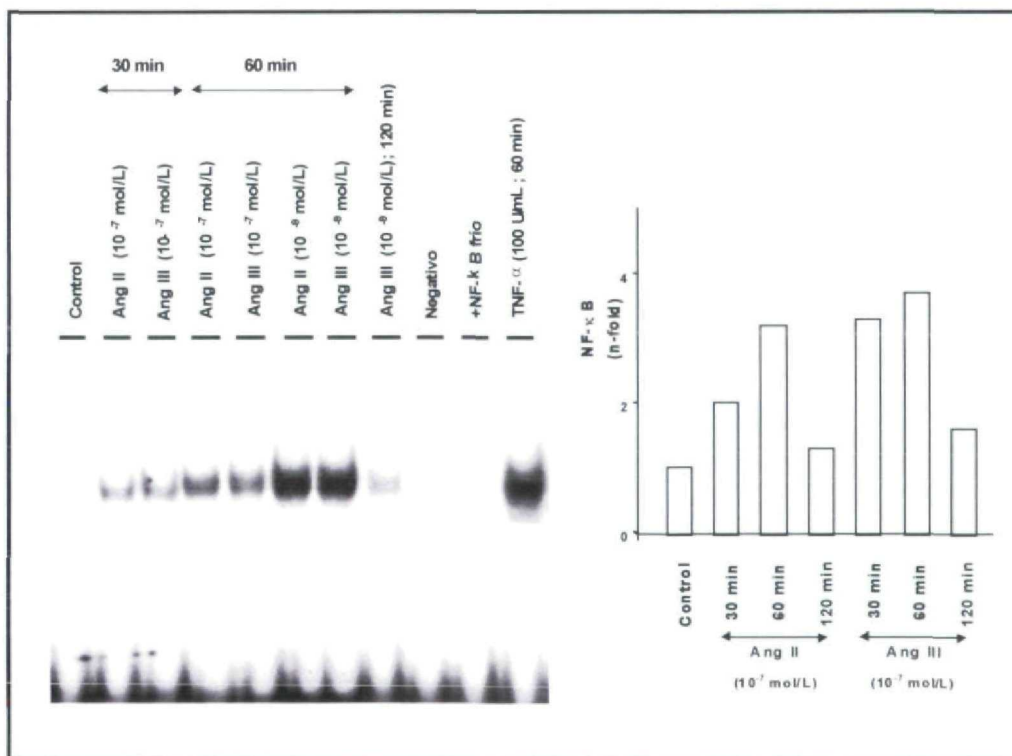


Figura 39. La AngIII activa de modo dosis-tiempo dependiente al factor NF- κ B. Las células mesangiales se estimularon durante 30, 60 o 120 min con AngIII o AngII (10^{-7} o 10^{-9} mol/L). La especificidad de la reacción fue establecida utilizando ensayos de competición con un exceso (100-veces) de NF- κ B no marcado. Como control positivo se utilizó el TNF- α , y negativo, un punto sin extracto nuclear. A la derecha se muestra el análisis de los resultados expresados como incremento de n-veces frente control en unidades arbitrarias de densitometrado.

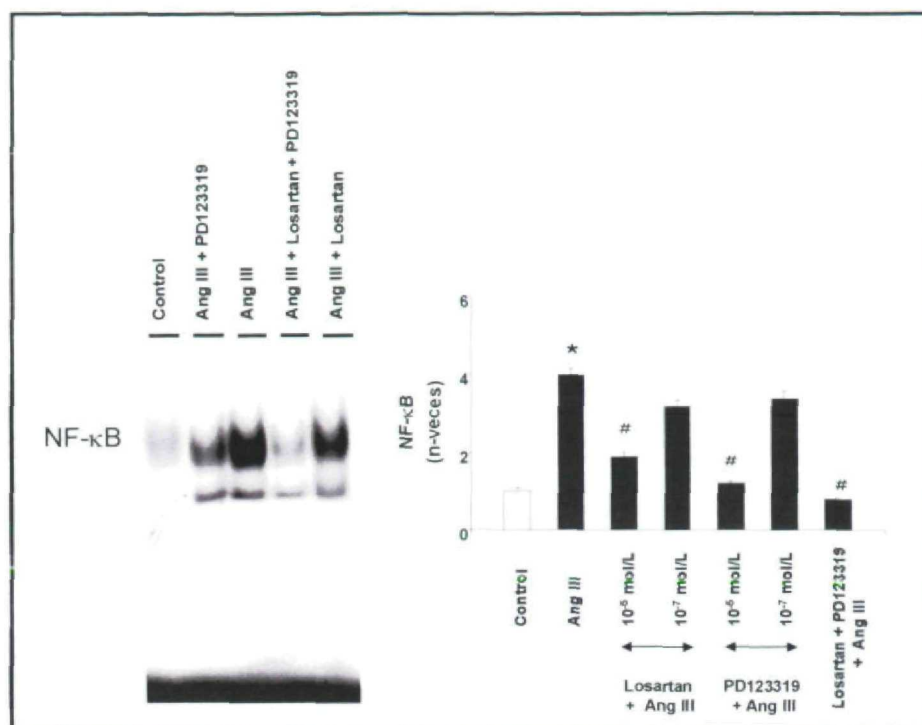


Figura 40. Papel de los receptores AT_1 y AT_2 en la activación de NF- κ B inducida por AngIII en células mesangiales. Las células fueron preincubadas durante 1h con los antagonistas AT_1 (Losartan) y/o AT_2 (PD123319) (10^{-5} a 10^{-7} mol/L), y luego estimuladas con 10^{-7} mol/L AngIII durante 30 min. La figura muestra un experimento representativo de 4-6 realizados. A la derecha se muestra el análisis de los resultados expresados como incremento de n-veces frente control en unidades arbitrarias de densitometrado de la media \pm EEM de 4-6 experimentos. * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs AngII sola; † $p < 0.05$ vs AngIII sola; @ $p = n.s.$ vs control.

En otros puntos, las células mesangiales se pretrataron con el antagonista AT_1 (Losartan; 10^{-5} a 10^{-8} mol/L) y/o con el AT_2 (PD123319; 10^{-5} a 10^{-7} mol/L) durante 1 hora, y después se estimularon con AngIII (10^{-7} mol/L) durante un tiempo adicional de 30 min. El Losartan disminuyó, de modo dosis dependiente la activación de NF- κ B inducida por AngIII, máximo a 10^{-5} mol/L (62% inhibición vs AngIII, $n = 6$). El PD123319 también disminuyó de modo dosis dependiente la activación de NF- κ B inducida por AngIII, siendo máximo a 10^{-5} mol/L (86% inhibición vs AngIII, $n = 6$) (figura 40). Cuando se trataron estas células con los dos antagonistas a la vez, la activación de NF- κ B fue abolida por completo. Resultados similares se observaron en el caso de células mononucleares y vasculares, donde la AngIII activó NF- κ B a través de ambos receptores, predominantemente vía AT_2 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que, en células mesangiales, monocíticas y vasculares, la activación de NF- κ B inducida por AngIII está mediada, al igual que la AngII, por ambos receptores AT_1 y AT_2 , aunque probablemente la AngIII utiliza preferentemente el AT_2 .

6.1.1 Estudio del efecto de la AngIII en la activación de NF- κ B en células AT₁(-/-):

Con el fin de confirmar la importancia del receptor AT₂ en la activación de NF- κ B inducido por AngIII, realizamos ensayos de EMSA en células mesangiales de ratones AT₁(-/-). En estas células, la AngIII y la AngII causaron un incremento en la activación de NF- κ B tras 30 y 60 min de incubación y disminuyendo al cabo de los 120 min (3.3- y 2.6- veces vs basal, AngIII y AngII respectivamente) (figura 41).

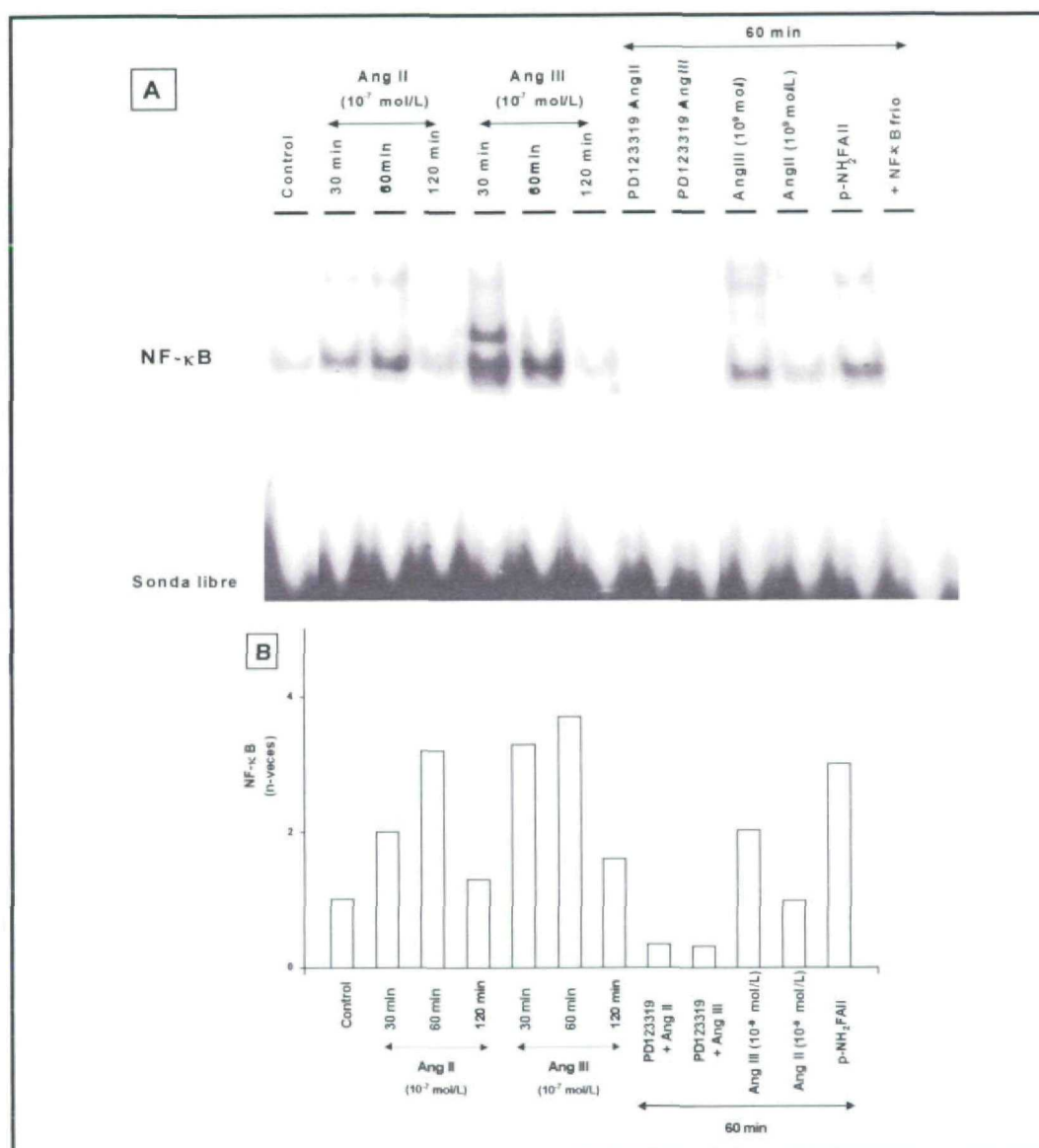


FIGURA 41. La AngIII activa el NF- κ B en células mesangiales de ratones AT₁(-/-). Las células fueron estimuladas con AngIII o AngII (10⁻⁷ mol/L, desde 30 a 120 min, y con 10⁻⁹ mol/L durante 60 min), o con el agonista AT₂, pNH₂FAII (10⁻⁷ mol/L, durante 60 min). En otros puntos del experimento, las células fueron pretratadas durante 1h con el antagonista AT₂ (PD123319; 10⁻⁵ mol/L), y posteriormente estimuladas con 10⁻⁷ mol/L AngIII o AngII durante un periodo adicional de 60 min. La especificidad de la reacción se estableció con un exceso (100 veces) de NF- κ B no marcado. La figura (A) muestra un experimento representativo de EMSA de dos realizados, y la figura (B), los resultados expresados como incremento de n-veces frente a control en unidades arbitrarias densitométricas.

Como podemos observar, en células $AT_1(-/-)$ la activación de NF- κ B inducido por AngIII es algo más elevada que la AngII (tras 30 min de incubación). El pretratamiento con el antagonista AT_2 (PD123319) abolió la activación de NF- κ B para AngIII (figura 41). Por lo tanto, podríamos concluir de nuevo que la AngII y la AngIII actúan vía AT_1 y AT_2 , pero la afinidad de la AngII es mayor por el AT_1 , y la AngIII, por el AT_2 .

6.2 Degradación de $I\kappa B\alpha$ inducido por AngIII. Comparación con la AngII. Papel de los receptores AT_1 y AT_2 .

En células mesangiales, la subunidad $I\kappa B\alpha$ citosólica fue encontrada también como una proteína de alrededor de 39 KDa. Después de 30 min de incubación con AngIII, la banda correspondiente desapareció rápida y transitoriamente (figura 42). Al igual que sucedía con la AngII, el pretratamiento con los antagonistas de los receptores AT_1 o AT_2 (Losartan o PD123319, respectivamente), inhibió parcialmente la degradación de $I\kappa B\alpha$ inducida por AngIII, aunque tuvo mayor efecto con el PD123319, sugiriendo que ambos receptores están involucrados en este proceso, principalmente el AT_2 .

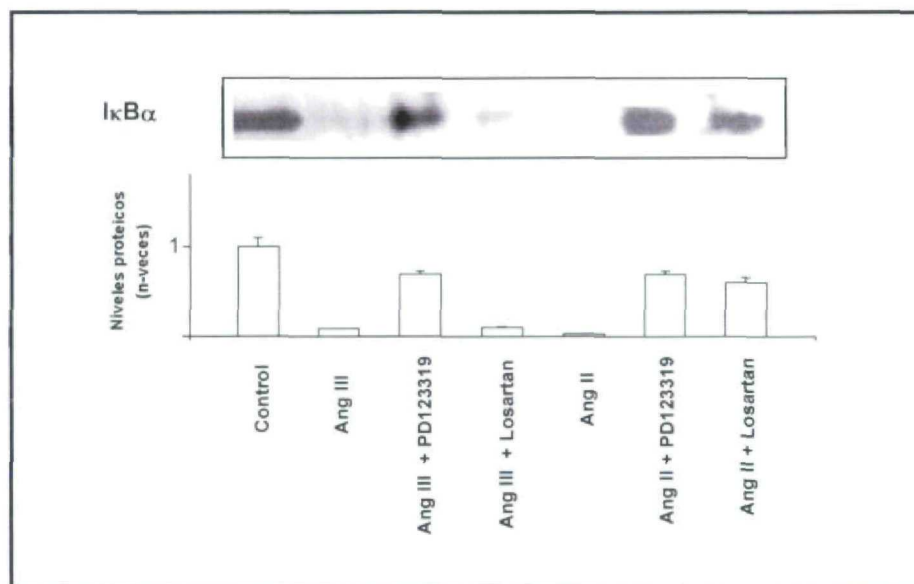


Figura 42. Regulación de $I\kappa B\alpha$ por AngIII en células mesangiales. Las células se estimularon con AngIII o AngII durante 30 min. En otras células, se incubó previamente 60 min con el antagonista del receptor AT_1 (Losartan) o con el del AT_2 (PD123319), y posteriormente se trató con AngIII o AngII durante 30 min suplementarios. En todos los casos se aislaron las fracciones citosólicas y se analizaron por Western blot frente a un anticuerpo específico frente a $I\kappa B\alpha$. En la parte superior de la figura podemos observar un Western representativo de tres realizados. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la media \pm EEM.

6.2.1 Efecto de la AngIII en los niveles citosólicos de I κ B α en células AT $_1$ (-/-):

Para asegurarnos de la existencia de la ruta principal AngIII/AT $_2$ /degradación de I κ B (y activación de NF- κ B), realizamos estos experimentos en células mesangiales de ratón deficientes del receptor AT $_1$. En estas células, la AngIII provocó una rápida degradación de I κ B α citosólico, que fue abolida por el PD123319 (figura 43). Resultados comparables se obtuvieron en células vasculares AT $_1$ (-/-) (no mostrados). Estos datos confirman que en estas células, el AT $_2$ prioritariamente participa en la degradación de I κ B α (y en la activación de NF- κ B) inducido por AngIII.

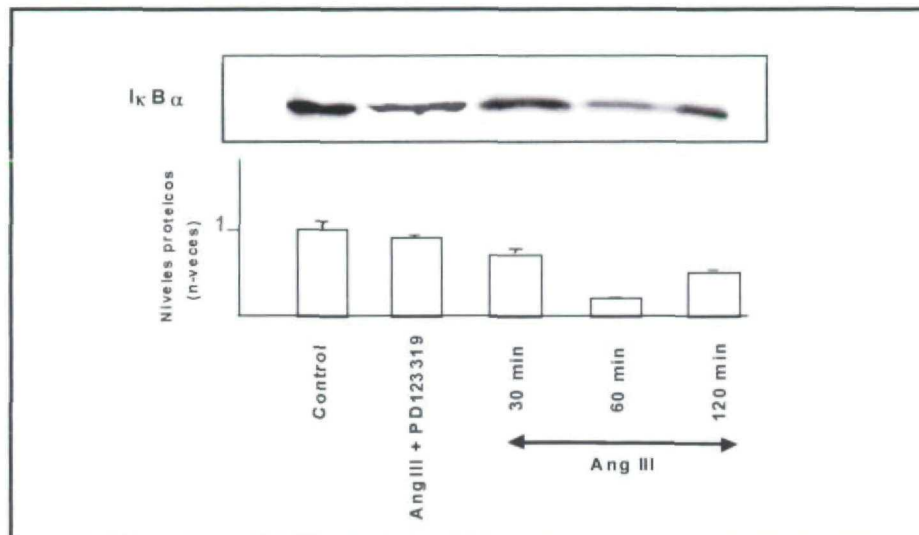


Figura 43. Regulación de I κ B α por AngIII en células deficientes del receptor AT $_1$. Las células mesangiales fueron estimuladas con AngIII desde 30 hasta 120 min. En otras células, se pretrató con el antagonista del receptor AT $_2$ (PD123319, 60 min), y posteriormente se incubó con AngIII durante 60 min suplementarios. En todos los casos se aislaron las fracciones citosólicas y se analizaron por Western blot frente a un anticuerpo específico de I κ B α . En la parte superior de la figura podemos observar un Western representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la media \pm EEM.

6.3 Papel de la AngIII en el reclutamiento celular.

Previamente se ha observado que existen receptores AT $_1$ y AT $_2$ en células mononucleares [189] y que la AngIII es quimioattractante para leucocitos [199]. Además, en fibroblastos cardíacos la AngIII aumenta la expresión de algunos genes, como el TGF- β y el Angiotensinógeno [200]. Sin embargo, el hecho de que la AngIII regule genes en el riñón, no ha sido aun estudiado.

6.3.1 Efecto de la AngIII en la expresión de MCP-1:

En primer lugar estudiamos el efecto de la AngIII en los niveles de mRNA de MCP-1 en células mesangiales. Las células fueron estimuladas con varias dosis de AngIII o AngII durante 3, 6 y 24h. Tras la incubación, se aisló el RNA y se determinó la expresión del mRNA de MCP-1 por Northern blot.

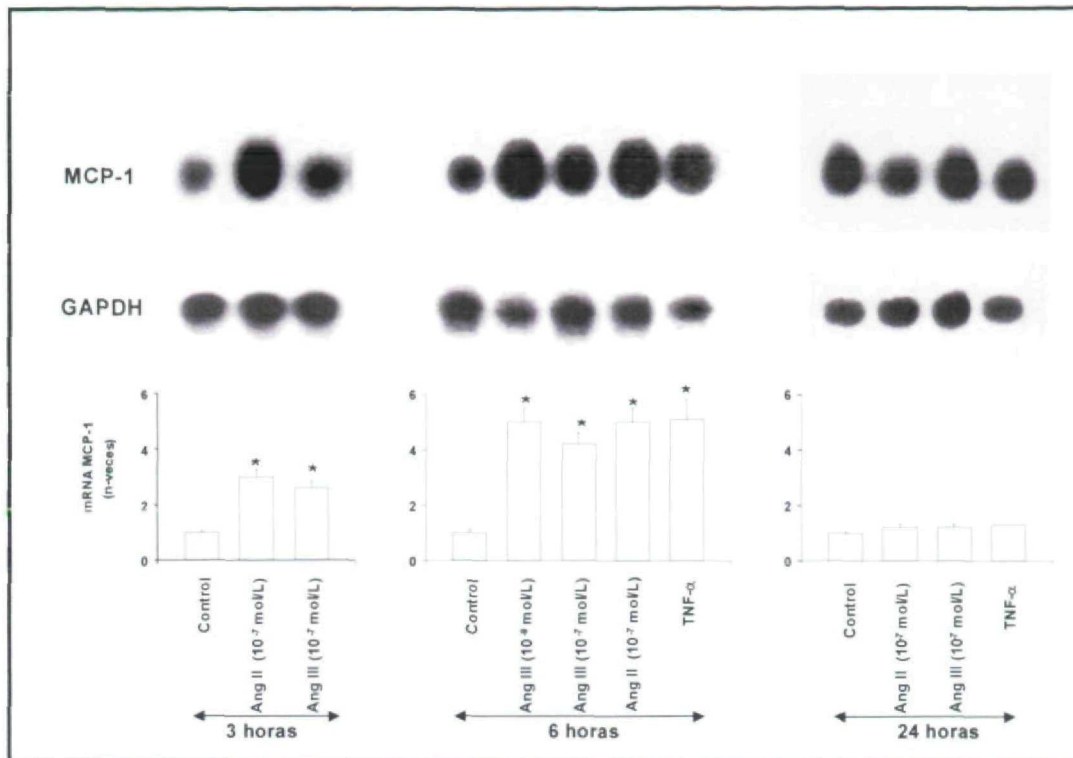


Figura 44. Efecto de la AngIII en la expresión del mRNA de MCP-1 en células mesangiales. Las células fueron incubadas durante 3, 6 o 24h con AngIII (10⁻⁷-10⁻⁹ mol/L) o AngII (10⁻⁷ mol/L). Transcurrido el tiempo de incubación, se aisló el RNA celular y se sometió a electroforesis y transferencia. La figura muestra un Northern blot representativo de cinco realizados correspondiente a la hibridación con la sonda del MCP-1 marcada radioactivamente con [α -³²P]-CTP (superior), y con la sonda de control interno (GAPDH), (medio). En la parte inferior se muestran los valores de las medias \pm EEM obtenidos por análisis densitométrico. *p< 0.05 vs control.

Al igual que la AngII, en respuesta a AngIII, en células mesangiales incrementaron la expresión del mRNA de MCP-1, máximo a las 6h y retornando a niveles basales tras 24h de incubación (figura 44). Este efecto fue además dosis dependiente con un máximo de respuesta a la dosis de 10⁻⁹ mol/L (alrededor de 4.2 veces incremento vs basal, p<0.05). Estos resultados muestran una cinética similar a la provocada por conocidos inductores de MCP-1; TNF- α (100 U/mL) y LPS 1 μ g/mL (dato no mostrado), como previamente ha sido descrito [168,201].

Además estudiamos si la sobreexpresión de MCP-1 por AngIII se realiza a través de la activación de NF- κ B como ocurre con la AngII. Así, en células mesangiales, la preincubación con inhibidores de la activación de NF- κ B, PDTTC o MG132 (durante 1h), disminuyó los niveles de activación de NF- κ B inducidos por AngIII (figura 45A). Este efecto se correlacionó con la inhibición de los niveles de mRNA de MCP-1 estimulados por AngIII a 6h (figura 45B).

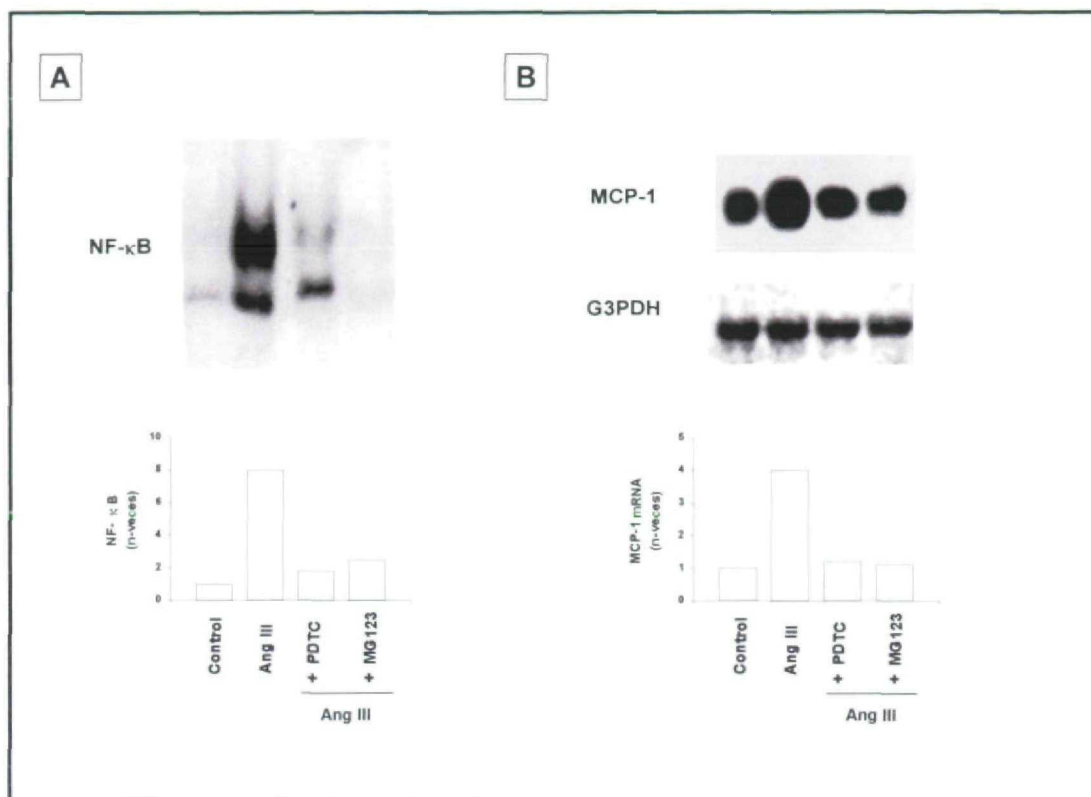


Figura 45. Efecto de los inhibidores de NF-κB en la expresión de MCP-1 inducido por AngIII. Las células mesangiales fueron preincubadas con dos inhibidores de la activación de NF-κB; el antioxidante PDTC (10^{-4} mol/L) o el inhibidor del proteosoma MG123 (10^{-5} mol/L) durante una hora y después estimuladas con AngIII (10^{-9} mol/L) durante 30 minutos (EMSA, A) o 6h (Northern, B). Transcurrido el tiempo de estimulación se aisló la fracción nuclear para ensayos de EMSA (A), o se separó el RNA celular para someterlo a análisis de Northern blot (B). El experimento muestra un experimento representativo de cuatro realizados.

6.3.2 Producción y localización intracelular de MCP-1 inducido por AngIII o AngII:

Para confirmar que la sobreexpresión de MCP-1 por AngIII o AngII en células mesangiales se traduciría en un aumento de sus niveles proteicos, realizamos ensayos de Western blot e inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal frente al MCP-1. Como podemos observar en la figura 46A, mediante Western comprobamos como la estimulación durante 6h con AngIII o AngII producía un aumento de la intensidad de la banda correspondiente al MCP-1 citosólico (14 KDa), de modo similar al TNFα (100 U/mL). Además, con el fin de localizar esta producción intracelular de MCP-1 en células mesangiales, medimos la inmunofluorescencia celular. Como vemos en la figura 46B, las células control mostraron una mínima inmunoreactividad citosólica para MCP-1, pero sin embargo, después de 6 h de estimulación con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) detectamos la reactividad positiva para el anticuerpo, indicando un aumento de la síntesis de MCP-1 celular.

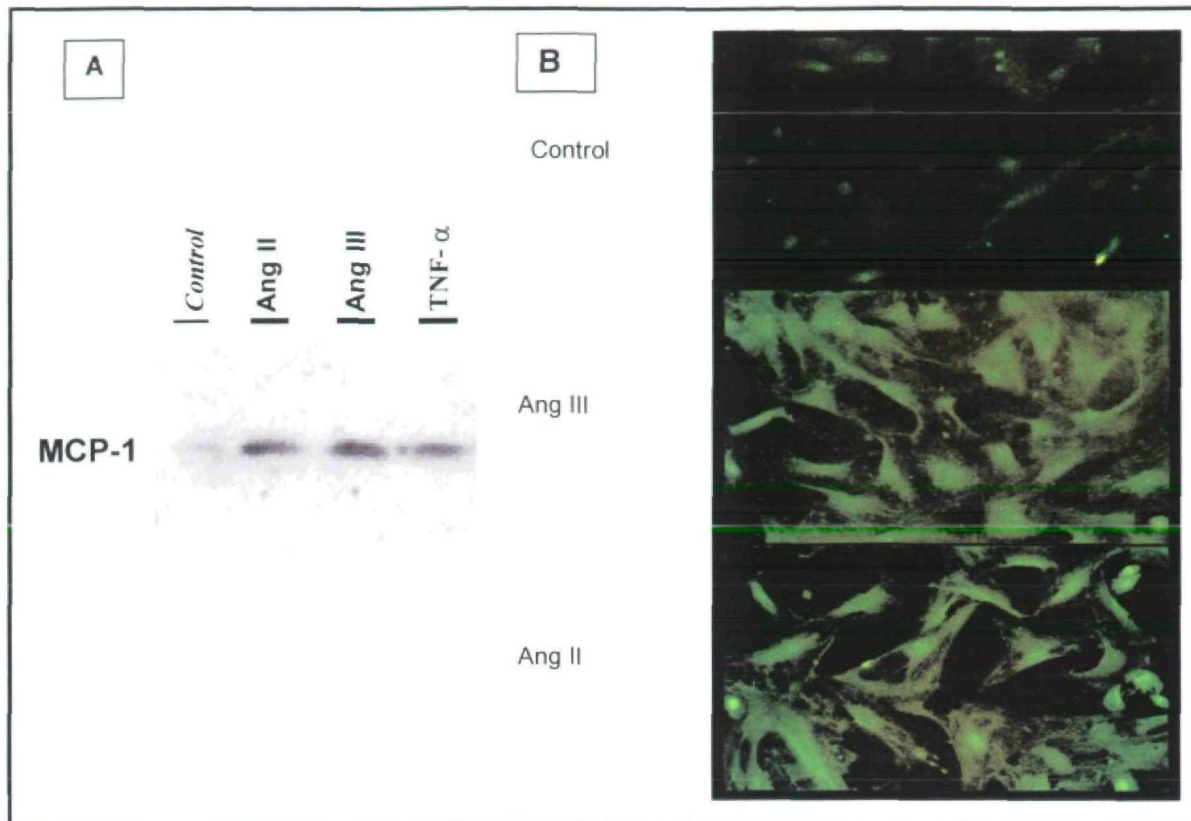


Figura 46. Producción y localización de MCP-1 en células mesangiales estimuladas con AngIII o AngII. (A) Por Western analizamos citosoles de células mesangiales control y tratadas con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) durante 6 horas. Como control positivo se utilizó la estimulación con $\text{TNF}\alpha$. (B) Mediante ensayos de inmunofluorescencia, apreciamos una débil tinción en células control para el MCP-1. En células estimuladas con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) durante 6 horas observamos un incremento de la intensidad de fluorescencia para la incubación con el anticuerpo frente al MCP-1.

6.3.3 Efecto quimiotáctico del MCP-1 inducido por AngIII

Con el propósito de investigar si la AngIII induce la producción de factores biológicamente quimioattractantes, estimulamos células mesangiales durante 18 horas con AngIII, AngII (10^{-7} mol/L) o $\text{TNF}\alpha$ (100 U/mL), y medimos la actividad quimioattractante en los sobrenadantes celulares. Para ello se realizó un ensayo de quimiotaxis empleando una línea celular de monocitos humanos (THP-1) (ver métodos). En sobrenadantes de células mesangiales sin tratar detectamos una actividad quimiotáctica basal. La estimulación con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) de los sobrenadantes de células mesangiales aumentó significativamente la actividad quimioattractante ($n=5$, $p < 0.05$ vs control). Este aumento fue similar al producido por el $\text{TNF}\alpha$ (figura 47A). Como control positivo de la migración de los monocitos THP-1 utilizamos MCP-1 recombinante de rata, y como control negativo, medio (RPMI) sólo. Similares resultados fueron observados previamente en células mesangiales humanas estimuladas con citoquinas proinflamatorias [168,201].

Para investigar si la migración inducida por las angiotensinas es debida a la producción específica de MCP-1 por las células mesangiales, realizamos experimentos

de neutralización (ver métodos). Utilizando un anticuerpo frente a MCP-1 recombinante de rata (10 µg/mL) observamos que se producía una inhibición de la actividad quimioattractante del MCP-1 de alrededor del 97%. El tratamiento de sobrenadantes de células mesangiales (estimuladas con AngII o AngIII) con el anticuerpo frente a MCP-1 redujo esta actividad a valores similares a células no estimuladas (40% de inhibición) (figura 47B). La especificidad de la reacción fue realizada incubando con un anticuerpo control sin actividad quimiotáctica (IgG) (menos del 5% de inhibición de quimiotaxis; no mostrado). Estos datos sugieren que la AngIII podría participar en procesos inflamatorios a través de la producción de MCP-1 el cual posee actividad biológica para las células residentes. Además medimos la quimiotaxis directa producida por los péptidos de angiotensina. La AngIII, AngII o MCP-1 se resuspendieron en medio (RPMI) libre de suero y se incubaron durante diferentes periodos de tiempo. Tras una hora, sólo el MCP-1 de rata (100 ng/mL) mostró una respuesta significativa quimioattractante ($n=10$, $p < 0.05$ vs control), mientras que a 4 horas, se produjo un incremento en la migración de monocitos para AngIII y AngII (10^{-7} mol/L, $n=5$, $p < 0.05$ vs control; figura 47C). Estos datos sugieren que los propios péptidos de angiotensina poseen un potencial efecto directo quimioattractante para monocitos, tras largos periodos de incubación.

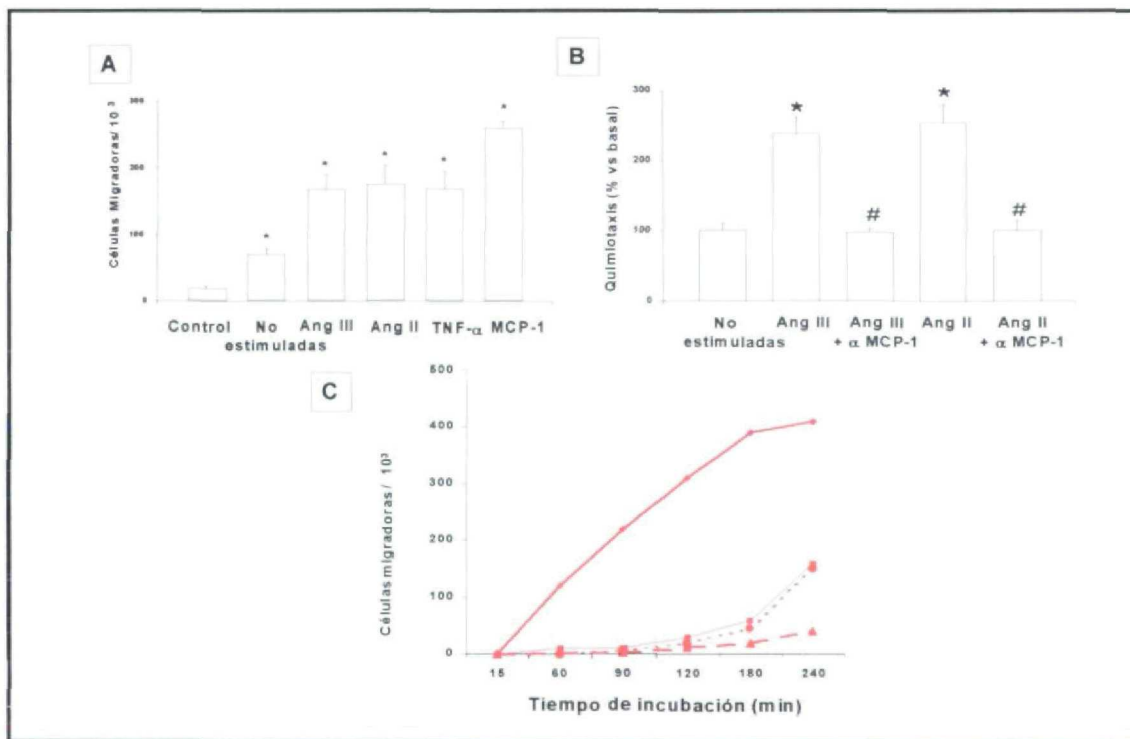


Figura 47: Quimiotaxis inducida por AngIII o AngII en células mesangiales. (A) Los sobrenadantes de células mesangiales estimulados con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L), TNF- α (100 U/mL) o MCP-1 (10 µg/mL) poseen actividad quimioattractante para monocitos THP-1. Como control positivo se utilizó medio RPMI sólo. (B) Ensayo de neutralización de quimiotaxis para AngIII y AngII con anticuerpo frente al MCP-1. (C) Efecto directo de los péptidos del SRA (AngIII y AngII) en la atracción de monocitos THP-1. Línea continua, MCP-1; Puntos cuadrados, AngIII; Puntos redondos AngII, y Puntos triangulares, RPMI sólo.

7. PAPEL DE LA ANG III EN LA PROLIFERACIÓN Y FIBROSIS RENAL.

7.1 *La AngIII regula la expresión del angiotensinógeno en células mesangiales.*

Como ya hemos demostrado, la AngIII activa NF- κ B con potencia similar a la AngII. Por otro lado, el promotor del gen del Angiotensinógeno contiene elementos de respuesta al factor de transcripción NF- κ B [202]. Sin embargo, no existe evidencia de que los péptidos derivados de la AngII pueden modular la expresión de Angiotensinógeno. En algunos estudios en hígado y riñón, los niveles de Angiotensinógeno y renina son regulados por AngII. Ya hemos observado que en células mesangiales, la AngII induce la expresión de Ao, con lo que contribuye a la propia regeneración del SRA. En nuestros experimentos, como se puede observar en la figura 48A por RT-PCR, la estimulación de células mesangiales con AngIII (10^{-7} mol/L) durante 6h, provocó un aumento del mRNA del angiotensinógeno (2.8 veces vs control) de modo similar a lo observado con AngII (2.7 veces vs control) y TNF- α (no mostrado).

7.2 *La AngIII induce la expresión del proto-oncogen c-fos*

La proliferación de células residentes constituye un hecho relevante en la mayoría de las enfermedades renales progresivas. El gen c-fos es un protooncogen de respuesta temprana relacionado con la proliferación, diferenciación e hipertrofia celular [203], pero además, este gen se transcribirá a proteína c-Fos la cual forma parte del factor AP-1. Se ha demostrado previamente que la AngII induce la sobreexpresión de c-fos y que la AngIII que es capaz de inducir proliferación con potencia similar a la AngII [204,205].

En células mesangiales renales quiescentes estimuladas con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) durante 1h, observamos mediante Northern que la AngIII induce la expresión de c-fos de modo similar a la AngII (3.7 y 3.2 veces vs control, respectivamente) (figura 48B).

7.3 *La AngIII regula la expresión de TGF- β y la síntesis de fibronectina*

El factor de crecimiento transformante (TGF β) es un factor de crecimiento que contribuye al acúmulo de matriz extracelular a través de la síntesis de proteínas de matriz como la fibronectina [180]. El TGF β juega un papel primordial en la patogenia del daño renal, conduciendo a la fibrosis y a la disfunción renal [206,207]. El TGF β contribuye al acúmulo de matriz extracelular incrementando su producción, inhibiendo su degradación y modulando los receptores para las citoquinas. La fibronectina es una proteína de matriz sintetizada inmediatamente durante el daño renal, precediendo al acúmulo de colágeno y a la formación de fibra [133]. Basalmente, la mayor parte de fibronectina producida por los fibroblastos es secretada al medio extracelular (70% del total). Se ha demostrado que la AngII induce la expresión génica de TGF β , por lo que investigamos el papel de la AngIII en la regulación de matriz, estudiando la expresión y síntesis de TGF- β y fibronectina, en células mesangiales. En estas células, la estimulación

durante 6 h con AngIII (10^{-7} mol/L) aumentó la expresión de TGF- β con potencia similar a la producida por AngII (10^{-7} mol/L) (figura 48C).

Mediante ensayos de marcaje metabólico e inmunoprecipitación, observamos que la AngIII y AngII (10^{-7} mol/L) durante 24h inducen la síntesis de fibronectina (incremento del $155 \pm 14\%$ y $165 \pm 12\%$ vs control, $n=3$; $p<0.05$, respectivamente). Como control positivo de los experimentos se utilizó un conocido inductor de la síntesis de fibronectina, como es el propio TGF- β (5×10^{-12} mol/L) (incremento del $220 \pm 18\%$ vs control, $n=3$, $p<0.05$) (figura 48D).

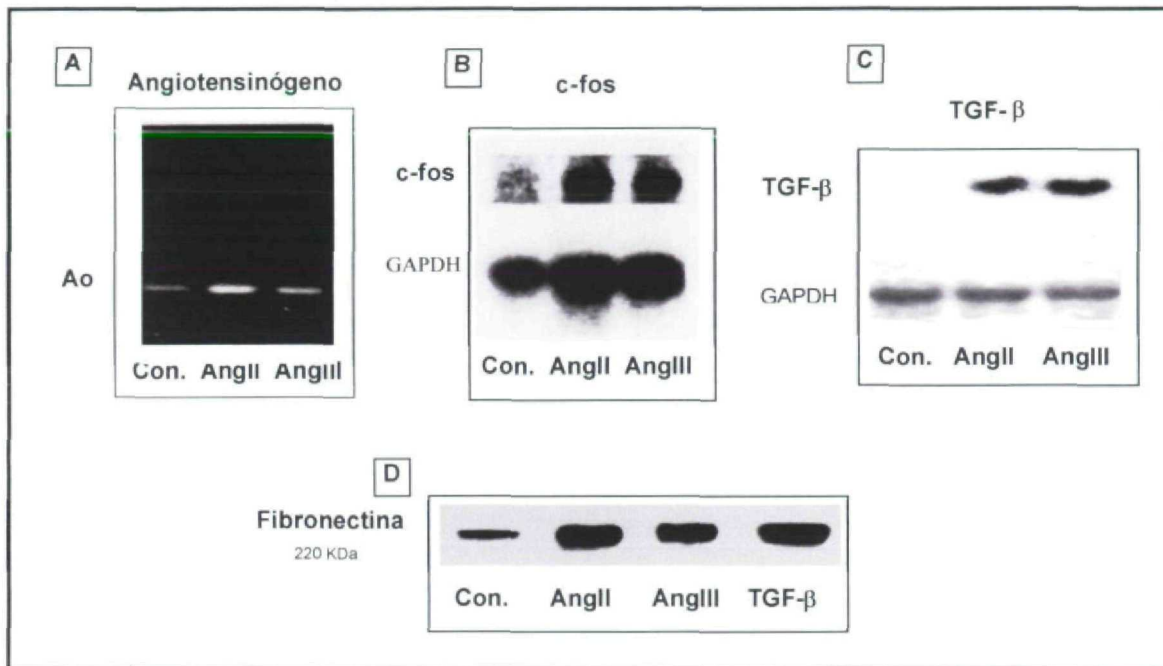


Figura 48. Participación de la AngIII en procesos de proliferación y fibrosis renal. (A) La AngIII aumenta la expresión de Angiotensinógeno. El RNA de células estimuladas durante 6 h con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) fue analizado por RT-PCR. La figura muestra un experimento representativo de 4 realizados. (B) La AngIII induce la expresión de c-fos. Las células mesangiales estimuladas 1 h con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) sobreexpresan el protooncogén c-fos. Los valores fueron corregidos por GAPDH. (C) La AngIII incrementa la expresión de TGF- β . La estimulación de células mesangiales con AngIII o AngII (10^{-7} mol/L) provoca un aumento de los niveles de mRNA de TGF- β . Los valores fueron corregidos por GAPDH. (D) Producción de fibronectina por AngIII. Las células se marcaron metabólicamente con ^{35}S -Metionina, en presencia de 0.5% de STF, y se incubaron durante 24h con AngIII o AngII, cuantificándose posteriormente la síntesis de fibronectina mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-fibronectina. Se muestra una autorradiografía representativa del análisis por PAGE-SDS de la fibronectina soluble.

Estos resultados nos sugieren que la AngIII podría contribuir en procesos de fibrosis renal, participando en varias etapas del daño; aumentando los niveles de c-fos (proliferación), incrementando la expresión y producción de TGF- β y fibronectina (producción de matriz extracelular), y estimulando la expresión de Angiotensinógeno (regeneración del SRA). Además, hemos observado que la AngIII estimula la síntesis de sustancias quimiotácticas (MCP-1) con capacidad de atraer células mononucleares, y

así poseer un posible papel en procesos de reclutamiento celular durante el daño renal.

Estos datos aportan una nueva visión del SRA donde no solo la AngII está implicada en el daño renal, sino que su péptido de degradación, la AngIII posee potencialmente un papel activo en estos procesos.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La AngII activa factores de transcripción en riñón y vaso

En situaciones patológicas, incluidas nefritis y aterosclerosis, se ha descrito un aumento en la actividad tisular del factor de transcripción NF- κ B [56,70,142,147]. El creciente interés por el NF- κ B está basado en su papel como regulador de la expresión de muchos genes proinflamatorios codificadores de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión. El bloqueo del NF- κ B mediante transfección génica de I κ B o tratamiento con PDTC (antioxidante) disminuye su activación coincidiendo con la mejora del daño renal y vascular, lo que sugiere que la regulación de NF- κ B podría ser una diana terapéutica en enfermedades renales y cardiovasculares [5,70]. Los iECA disminuyen la actividad de NF- κ B en modelos de nefritis, hipertensión y aterosclerosis [5,56,70]. Nuestros datos demuestran que *in vivo* la AngII activa el NF- κ B tisular. En el riñón hemos observado que los animales infundidos con AngII, presentaron tinción nuclear positiva para el NF- κ B en células residentes renales e infiltrantes. Los complejos NF- κ B activados se localizaron principalmente en el glomérulo (células mesangiales, endoteliales y epiteliales), células tubuloepteliales y arterias renales (células endoteliales y de músculo liso vascular). En aortas torácicas de rata, la infusión de AngII activó el factor NF- κ B en células endoteliales y de músculo liso vascular. En este trabajo hemos demostrado que también, en células epiteliales tubulares en cultivo, mesangiales y vasculares, la AngII activa NF- κ B de manera dosis-dependiente con una cinética similar a la provocada por citoquinas proinflamatorias como el TNF- α . En conjunto, estos datos demuestran firmemente que la AngII *in vivo* e *in vitro* activa NF- κ B en el riñón y en el vaso, y por lo tanto, puede tener un papel activo en procesos de daño tisular a través de la ruta de activación de este factor.

Además del NF- κ B, diversos factores de transcripción se han visto implicados en situaciones de daño tisular. En modelos de aterosclerosis y nefritis se ha encontrado niveles aumentados del factor AP-1 [148,151,152,209]. Este factor está implicado en procesos de producción de matriz extracelular y fibrosis. En este trabajo, en respuesta a la infusión de AngII, hemos observado que se produce un aumento de la actividad de AP-1 en el riñón (en glomérulo y túbulo) e *in vitro* hemos mostrado que la AngII es capaz de inducir la activación de AP-1 en células tubulares de modo similar a otros conocidos inductores como el PMA. En un modelo de daño vascular se observó un aumento de AP-1 [210], y en otro de infusión de AngII se ha observado un incremento de la actividad renal de AP-1, pero no así del factor SP-1 [149]. En conjunto, estos datos sugieren que la AngII posiblemente produce sus efectos a través de la activación de diversos factores nucleares como NF- κ B y AP-1.

La AngII es un nuevo mediador proinflamatorio a través de la activación de NF- κ B

Una nueva área de investigación sobre este péptido vasoactivo del SRA es su papel potencial en la respuesta inmune. La AngII participa en la patogenia de las enfermedades renales inmunes [5]. En nuestros experimentos hemos observado que la infusión de AngII induce un aumento en el número de células inflamatorias en el glomérulo y, de forma más marcada, en el intersticio, en general de manera focal. En este trabajo demostramos además que la AngII activa NF- κ B en monocitos en cultivo (línea U937), y que en animales infundidos con AngII, las células inflamatorias infiltrantes presentaban a su vez complejos activos de NF- κ B. Por otro lado, en estudios *in vitro* hemos demostrado que las células residentes renales responden a la estimulación de AngII con activación de NF- κ B y sobreexpresión de genes relacionados como MCP-1 y, como han observado otros autores, RANTES [5,74], quimioquinas responsables de la infiltración de monocitos en el riñón.

La AngII regula respuestas de células del sistema inmune, induce quimiotaxis de leucocitos y adhesión de monocitos al endotelio [213]. En sobrenadantes de células mesangiales estimuladas con TNF- α o IL-1 β aumentó la producción de MCP-1 humano con actividad quimioattractante para monocitos [168]. En este trabajo hemos demostrado que la AngII es quimiotáctica para monocitos y que en sobrenadantes de células mesangiales estimuladas con AngII encontramos un aumento de la actividad quimiotáctica, que es neutralizada con anticuerpos anti-MCP-1. Además, la infusión de AngII aumentó la producción renal y vascular de TNF- α , que podría regular la producción de factores de crecimiento, citoquinas y otras quimioquinas, con potencial actividad quimioattractante.

Por otro lado, una característica común a todos los estadios de la aterosclerosis, es la inflamación de la pared vascular. La activación de NF- κ B ha sido observada en lesiones ateroscleróticas [175], y en cultivos de células endoteliales y de músculo liso vascular estimuladas con AngII [74,176]. Nosotros hemos observado la activación de NF- κ B en arterias renales y aorta torácica (localizado en células vasculares y endoteliales) en respuesta a la infusión de AngII. Además, *in vitro*, hemos demostrado que la AngII en células vasculares aumenta la capacidad de unión del NF- κ B al DNA (EMSA), la actividad transcripcional dependiente de NF- κ B (experimentos de transfección), y la expresión de algunos genes regulados por este factor, como el MCP-1 y Angiotensinógeno. En células vasculares y endoteliales, la AngII incrementa los niveles de genes proinflamatorios como quimioquinas y moléculas de adhesión [3,5,6,168] e induce la adhesión de monocitos [212,213]. En estos fenómenos se ha observado la implicación del NF- κ B.

Otros autores han observado que la infusión de AngII en ratas sanas provoca hipertensión caracterizada por un claro de VCAM-1 [176]. En ratas hipertensas existe un aumento de MCP-1 en aorta [176], y la presencia de monocitos/ macrófagos en la pared vascular es reducida por iECAs [215]. En un modelo experimental de aterosclerosis, la inhibición de la ECA disminuyó la actividad de NF- κ B y la expresión de

quimioquinas en la lesión [70]. Mediante estudios en ratones deficientes del receptor CC para MCP-1, CCR2, se ha demostrado la contribución del reclutamiento de macrófagos en el daño vascular inducido por AngII [216]. Todos estos datos sugieren que la AngII podría contribuir a la respuesta inflamatoria en enfermedades como la aterosclerosis e hipertensión, vía activación de NF- κ B y a través de la regulación de genes vasculares proinflamatorios.

Estos datos sugieren que el efecto de la AngII en el reclutamiento de células inflamatorias, podría ser directo, a través de la activación de células mononucleares, e indirecto, vía producción de quimioquinas y aumento de la expresión de moléculas de adhesión por células residentes, todos estos procesos mediados por la activación de NF- κ B (figura I).

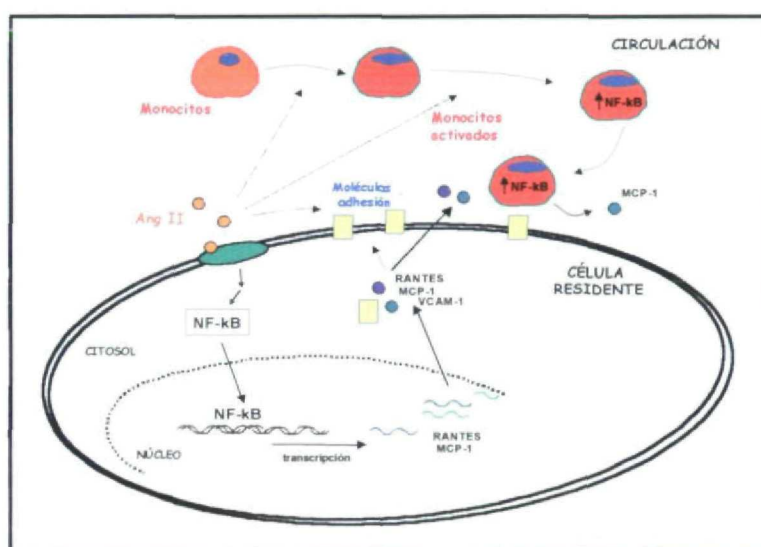


Figura I. Implicación de la AngII en procesos proinflamatorios. La AngII interviene en diferentes etapas del proceso inflamatorio. Activa monocitos, induce la expresión de quimioquinas desde células circulantes y residentes, y estimula la síntesis de moléculas de adhesión. Todo ello a través de la activación de NF- κ B).

Por otro lado, la AngII podría participar en el reclutamiento de células mononucleares a través de la liberación de lípidos con propiedades proinflamatorias como prostaglandinas. Este efecto también es atribuido a la activación de la fosfolipasa A2, pero además recientemente se ha observado en células vasculares que la AngII sobreexpresa COX-2 (a través de la vía AT₁/MAP quinasas) [217]. La inducción de COX-2 también se ha demostrado en aterosclerosis humana y en el daño vascular [218,219], pero aun no se conoce bien el significado biológico. La hipertensión inducida por AngII provocó un incremento de los niveles del leucotrieno A4 hidrolasa, enzima esencial para la conversión de leucotrieno A en el lípido mediador inflamatorio leucotrieno B (LTB₄) [220].

Todos estos datos demuestran que la AngII participa en varias etapas del proceso inflamatorio contribuyendo en el inicio y progresión de la aterosclerosis e hipertensión. De este modo, los efectos beneficiosos de fármacos moduladores de las acciones de la

AngII, pueden ser debidos al menos en parte a la supresión de la activación de monocitos y a la disminución de la síntesis de factores quimiotácticos producidos por las células vasculares. Por tanto, nuestros datos *in vivo* e *in vitro* apoyan la nueva idea de que la AngII podría considerarse como un modulador proinflamatorio a través de la activación del factor nuclear NF- κ B, tanto en riñón como en vaso.

La AngII activa el factor nuclear NF- κ B a través de AT₁ y AT₂

Como se ha comentado anteriormente, la AngII actúa a través de los receptores AT₁ y AT₂. El subtipo de receptor implicado en el daño renal no está completamente definido. Los antagonistas AT₁ son utilizados en clínica en el tratamiento de hipertensión y proteinuria en pacientes con nefropatías [221]. En modelos experimentales de daño renal, los antagonistas AT₁ disminuyen la proteinuria, el acúmulo de matriz y la producción de factores de crecimiento, como el TGF- β [28,29,179]. En arteriolas renales se ha observado cómo la infusión de AngII incrementa la liberación de NO y el tratamiento con antagonistas AT₁ reduce este efecto [222]. Sin embargo, en un modelo de hipertensión, el Losartan no disminuyó la hipertrofia de la pared vascular ni la expresión de PDGF-A [223]. Los estudios realizados con antagonistas AT₂ y en ratones deficientes del gen AT₂, apoyan la idea de que este receptor participa en la fisiopatología renal y vascular [28,36]. Así, se ha demostrado que el AT₂ regula la presión sanguínea, la producción de cGMP en respuesta a deplección de sodio, la natriuresis vía bradiquinina/NO, la producción de prostanoïdes [36] y el infiltrado de monocitos a nivel renal. Sin embargo, la obstrucción unilateral en ratones deficientes del receptor AT₂ provocó fibrosis intersticial acelerada y depósito de colágeno [224].

Nosotros observamos que en ratas infundidas con AngII el tratamiento con el antagonista AT₁ Losartan restaura la presión sanguínea y mejora el daño tubular, mientras que la administración del antagonista AT₂ PD123319 disminuye el infiltrado de células inflamatorias. Para profundizar en los mecanismos moleculares del daño renal causado por AngII evaluamos el receptor implicado y la distribución de NF- κ B. En animales infundidos con AngII, ambos antagonistas AT₁ y AT₂, disminuyen la actividad de NF- κ B, mientras que sólo el AT₁ bloquea la activación de AP-1. Además, se observaron diferencias en la distribución tisular de NF- κ B activado por la AngII. Ambos antagonistas disminuyeron la tinción positiva para NF- κ B en el glomérulo, pero sin embargo el Losartan disminuyó marcadamente el NF- κ B en células tubulares, mientras que el PD123319 actuó principalmente en células inflamatorias.

Para profundizar en el conocimiento de la ruta AngII/NF- κ B, realizamos estudios *in vitro*. En células epiteliales tubulares la AngII activó NF- κ B, principalmente vía AT₁, mientras que en células mononucleares, vasculares y mesangiales, la AngII activó NF- κ B a través de ambos receptores (AT₁ y AT₂). Mediante estudios en células mesangiales y vasculares de ratones deficientes del receptor AT₁, hemos observado que la AngII provoca un rápido aumento en la activación de NF- κ B, demostrando claramente que la

AngII es capaz también de activar NF- κ B vía AT₂ en riñón y vaso (figura II). Además, en un modelo de daño renal por obstrucción de uréter unilateral hemos observado que en ratones deficientes del receptor AT₁ se producía una activación del NF- κ B similar a la de ratones de fenotipo salvaje. En ambos ratones, el tratamiento con el antagonista AT₂ (PD123319) reducía a valores control esta activación. Todos estos datos sugieren que la AngII es capaz de utilizar ambos receptores, AT₁ y AT₂, en la activación de los factores de transcripción NF- κ B dependiendo del tipo celular y la situación patológica.

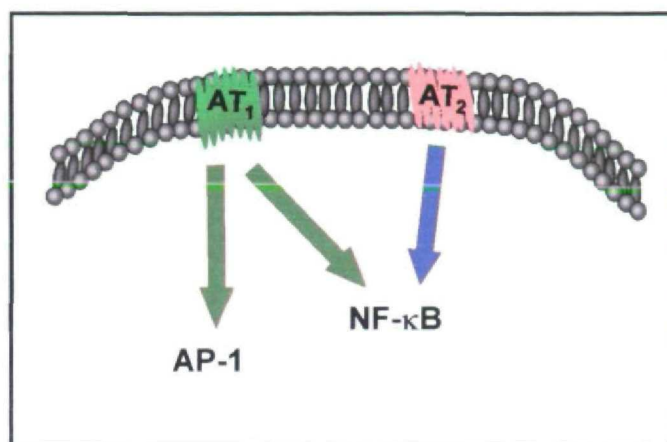


Figura II. Receptores de AngII implicados en la activación de factores de transcripción.

Mecanismos moleculares de la ruta de activación AngII/NF- κ B:

NF- κ B ha sido identificado como una importante proteína de unión al DNA que regula la transcripción de varios genes involucrados en el daño tisular [142,144,147]. Mediante ensayos de EMSA, hemos observado que en células mononucleares, mesangiales y de músculo liso vascular, la AngII causa una rápida, dosis-dependiente y transitoria activación de NF- κ B, con una potencia similar a citoquinas inflamatorias como el TNF- α .

En células no estimuladas, el NF- κ B permanece en el citosol como un complejo inactivo, estabilizado por la proteína inhibitoria I κ B [144]. Nosotros mostramos que en células mononucleares, vasculares y mesangiales, mediante experimentos de superretardo, el complejo NF- κ B activado por AngII es un heterodímero formado por las subunidades p50 y p65 (figura III). En estudios de Western blot detectamos que la subunidad p50 está constitutivamente expresada en el núcleo de las células vasculares, pero sin embargo, la expresión nuclear de p65 requiere activarse por la AngII. Se ha demostrado que la subunidad p50 interactúa directamente con las secuencias κ B del DNA de estos genes, mientras que la subunidad p65 no se une al DNA, y se sugiere que esta proteína podría tener una función reguladora del proceso [143]. Además, después de la estimulación con AngII, el patrón nuclear de marcaje inmunohistoquímico de ambas subunidades cambió de ser difuso citosólico (en células control), a prominentemente nuclear. Estos datos sugieren que el complejo activo de

NF- κ B en células mononucleares, mesangiales y de músculo liso vascular, está formado por las subunidades p50 y p65.

Por otro lado, la activación del factor NF- κ B requiere de la previa disociación de la subunidad I κ B del complejo p50/p65 mediante fosforilación y degradación de ésta por el proteosoma, en el citosol [191,192]. Tras la incubación de células vasculares con AngII, los niveles citosólicos de I κ B α disminuyeron rápidamente, mientras que los de I κ B β no se modificaron. Estas diferencias biológicas ya se habían observado en otros inductores de NF- κ B. IL-1 y LPS provocaron la rápida degradación de I κ B β , a diferencia del PMA y TNF- α , pero sin embargo, las cuatro moléculas degradaron I κ B α [191,192]. En nuestras células estimuladas con AngII, la degradación de I κ B α fue correlacionada en tiempo con la activación de NF- κ B y la translocación del complejo p50/p65 al núcleo, donde reconoce determinadas secuencias del DNA de genes para activar su transcripción (figura III). Después de dos horas de estimulación, comprobamos que se producía una resíntesis citosólica de la subunidad I κ B α . Por lo tanto, debido además a que el propio gen de I κ B α es controlado por NF- κ B [144,191], podríamos sugerir que la transactivación por NF- κ B incrementa también la síntesis de I κ B α , la cual puede restaurar los niveles de NF- κ B (p50-p65) inactivo citosólico.

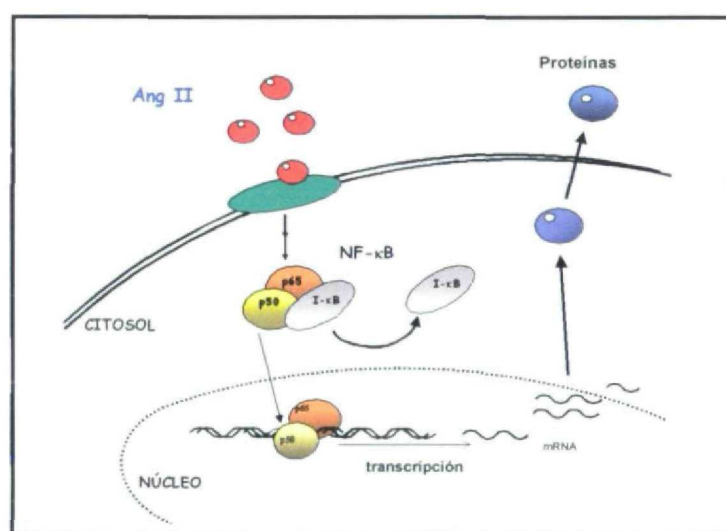


Figura III. Activación de NF- κ B inducido por AngII. La activación de NF- κ B en células renales, vasculares y mononucleares consiste en la disociación de la subunidad I κ B α del complejo NF- κ B (p50-p65) a la llegada del estímulo (AngII). Posteriormente, I κ B α es degradado en el citosol y el complejo NF- κ B entra en el núcleo para inducir la transcripción de determinados genes.

Papel del AT₂ en el infiltrado inflamatorio vía NF- κ B

Un hallazgo importante de nuestro trabajo es el papel potencial del AT₂ en procesos inflamatorios renales a través de la activación del NF- κ B. En animales infundidos con AngII, el antagonista AT₂ (PD123319) disminuyó el infiltrado de células mononucleares y la presencia de complejos NF- κ B activados en estas células. Algunos datos apoyan estas observaciones. La infusión sistémica de AngII durante 7-14 días en

ratas sanas se asoció con un influjo de monocitos/macrófagos en riñón [72]. Los iECA disminuyeron la actividad de NF- κ B y la expresión de genes controlados por este factor, como MCP-1, IL-6 y la molécula de adhesión VCAM-1, correlacionado con la disminución del infiltrado renal de monocitos [5,55]. En la nefritis inducida por la administración de anticuerpos anti-timocitos, dos antagonistas del AT₁ disminuyeron solamente alrededor del 30-50% la presencia glomerular de macrófagos/monocitos, acompañada con una significativa, pero no total, reducción de MCP-1, quimioquina regulada por NF- κ B [211,225]. En un modelo de nefropatía intersticial por obstrucción ureteral, la infiltración de monocitos/macrófagos se redujo por la administración de un iECA pero no por los antagonistas AT₁ [55]. Por otro lado, hemos observado que la AngII activa NF- κ B en ratones deficientes del receptor AT₁, y que un agonista de los receptores AT₂ también aumentó los niveles de activación y transcripción de NF- κ B. En riñón, la AngII induce infiltración de monocitos en el glomérulo y este proceso es inhibido por un antagonista AT₂ [74]. Además, los receptores AT₂ median la inducción de la quimioquina RANTES en células glomerulares endoteliales [74], demostrando una posible diana génica de la ruta AT₂/NF- κ B (figura IV). Aunque son necesarios más estudios en diferentes modelos de daño renal, se podría especular que las diferencias entre los iECA y los antagonistas AT₁ en relación con determinadas respuestas celulares como el reclutamiento de células inflamatorias, podrían ser debidas a la acción de la AngII sobre la actividad de NF- κ B a través de la unión a AT₂.

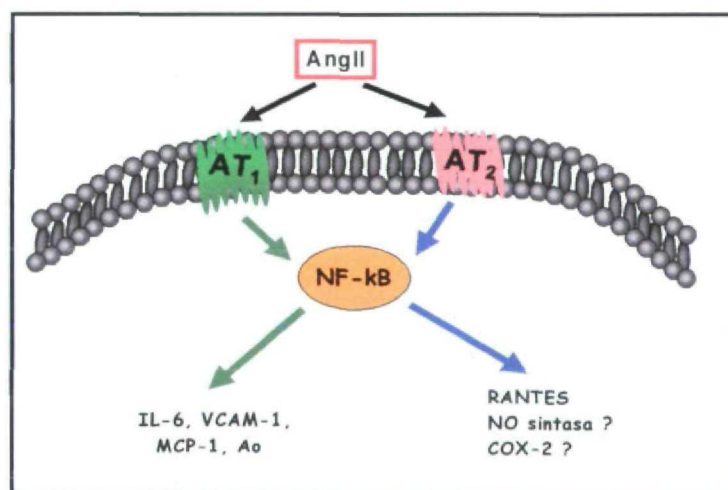


Figura IV. Sobreexpresión génica inducida por AngII. La AngII utiliza diferentes receptores para inducir la transcripción de determinados genes. A través del AT₁ aumenta la expresión de IL-6, VCAM-1, MCP-1 y Angiotensinógeno (Ao), y vía AT₂, RANTES y posiblemente NO sintasa y COX-2. Además, la sobreexpresión inducida por AngII de muchos de estos genes implica la previa activación de NF- κ B.

Otros posibles genes proinflamatorios candidatos a ser regulados por la vía AT₂/NF- κ B son la NO sintasa inducible, y la ciclooxigenasa-2 [38,39,46,47], las cuales

están implicadas en la producción de prostaglandinas y tromboxano, respectivamente, en enfermedades inflamatorias (figura IV).

La AngII participa en procesos inflamatorios a través de la ruta AT₁/NF-κB

En células en cultivo, la AngII vía AT₁/NF-κB sobreexpresa algunos genes como IL-6 y MCP-1 [5,28,103]. La infusión de AngII aumentó la expresión y producción de VCAM-1 de aorta, que fue reducida con Losartan [104,186], y nosotros observamos que los antagonistas AT₁ inhiben marcadamente el aumento en la expresión del mRNA de MCP-1 en células de músculo liso vascular. Observamos que la AngII eleva la producción de la proteína MCP-1 con actividad quimioattractante, y mediante el tratamiento con diferentes inhibidores de la activación del NF-κB, como PDTC y MG132, se bloquea la expresión de MCP-1 inducida por AngII. Además, en células de músculo liso vascular, la AngII aumentó la expresión de VCAM-1 y transactivó un promotor de VCAM-1 para NF-κB a través del AT₁ [176]. Todos estos datos sugieren que las acciones proinflamatorias de la AngII pueden estar mediadas por la inducción de genes inflamatorios vía AT₁/NF-κB (figura IV).

Otros genes relacionados con la ruta AngII/ NF-κB

Con el fin de conocer si la AngII a través también de la ruta AT₁/NF-κB es capaz de inducir la expresión de otros genes importantes en situaciones de daño tisular, estudiamos si era capaz de estimular su propia síntesis. Se ha demostrado previamente que la infusión de AngII en ratas incrementa los niveles circulantes del Angiotensinógeno y su expresión en riñón e hígado [242]. El Angiotensinógeno es controlado por NF-κB e inducido por AngII, y se encuentra sobreexpresado en hepatocitos a través de la ruta AT₁/NF-κB [202]. En fibroblastos cardíacos se ha demostrado la presencia intracelular de AngI, AngII y ECA [44], y en diversas situaciones de daño renal se ha observado un incremento en el mRNA del Angiotensinógeno [202,244] y de otros componentes del SRA [1,3].

La capacidad de generar AngII ha sido demostrada *in vitro* en diversos tipos celulares como células endoteliales y epiteliales tubulares renales [3]. Nosotros observamos que en células vasculares la AngII aumenta los niveles de expresión del Angiotensinógeno vía AT₁. Esto sugiere un posible mecanismo de retroalimentación autocrina mediante la producción de AngII local que podría contribuir a la perpetuación del daño tisular.

En esta Tesis hemos observado que AT₁ y AT₂ median la activación de NF-κB y la transcripción de un gen reportero de NF-κB. Todos estos datos sugieren que la AngII, actuando principalmente a través del AT₁, y en determinadas circunstancias, a través del AT₂, puede regular varios genes relacionados con NF-κB e involucrados en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares y renales (figura IV).

Diferencias entre AT₁ y AT₂ en la señalización del NF-κB

Muchos agentes activan el NF-κB, sin embargo los mecanismos de este proceso no son del todo conocidos [192-197]. Los receptores AT₁ y AT₂ poseen siete dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G [28,29], pero sus señales intracelulares son distintas (ver introducción). Nuestros datos sugieren que ambos receptores comparten una vía común: la activación del NF-κB. En células de músculo liso vascular comparamos los mecanismos moleculares implicados en este proceso.

Diferentes antioxidantes bloquearon la activación del NF-κB causada por AngII y por el agonista AT₂, lo que sugiere que los radicales libres de oxígeno (ROS) actúan como mediadores de ambos receptores, de modo similar a lo observado con TNF-α e IL-1β [36,197,234] (figura V). Previamente se ha observado que los ROS son mediadores de otros efectos de la AngII/AT₁, como la activación de AP-1, proliferación celular, síntesis de proteínas e hipertensión [29,235].

Por otro lado, los inhibidores de PTK disminuyen la activación de NF-κB inducida por AngII, pero no tienen efecto sobre el agonista AT₂, lo que demuestra que las PTKs son mediadoras solamente de la ruta AT₁/NF-κB (figura V). Sin embargo, observamos que la PKC no está involucrada en la activación de NF-κB inducida por AngII, pero sí por PMA. El papel de la PKC en la activación de NF-κB parece ser dependiente de la célula y/o estímulo específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la PKC media este efecto en células endoteliales estimuladas con H₂O₂ [187], pero no con TNF-α e IL-1β [191,234]. Algunos mecanismos de señalización del AT₁ son similares a los utilizados por citoquinas, como la activación de PTK, MAPK, JAK-STAT y AP-1 [28,29,36]. El sistema JAK-STAT activa las PTKs dependientes de ROS que podrían participar en la activación del NF-κB [237]. En diversos estudios se ha observado que la estimulación de NF-κB y AP-1 requiere de la activación de diversas proteínas quinasas como la v-SRC, Syk y Tec [142,148,238]. Las proteínas MAPK son requeridas para la activación de varios factores de transcripción, incluyendo NF-κB [236], pero se desconoce la implicación de la p38-MAPK en este proceso. El inhibidor de la p38-MAPK, el SB203580, disminuye la síntesis de citoquinas inducida por el TNF-α y bloquea la transactivación de NF-κB/luciferasa en respuesta a TNF-α, sin afectar a su translocación al núcleo [145]. Además, la inducción de MCP-1 por AngII está mediada por AT₁, señales redox, PTK y MAPK [71] (figura V). Todos estos datos sugieren un potencial mecanismo de la ruta AT₁/NF-κB/regulación génica, vía ROS, MAP-K y PTK, común a otras citoquinas proinflamatorias, como TNF-α e IL-1β.

El AT₂ está asociado a inhibición de MAPK, activación de proteína fosfotirosina fosfatasa y cambios en la actividad de fosfolipasa A₂ [36]. La fosforilación del IκB es un requisito para su degradación y consiguiente liberación del complejo NF-κB activo. *In vitro*, se han descrito varias proteínas quinasas que son capaces de fosforilizar al IκBα, como son la PRK, Raf1, PKC y Caseína quinasa II [191,240]. Por esta razón, tras la estimulación del AT₂ podríamos esperar la activación de algunas fosfatasas que regularían la degradación del IκB. Sin embargo, hemos observado que el AT₂ activa NF-

κ B (capacidad de unión al DNA y transcripción génica), sugiriendo que las fosfatasa inducidas por AngII no están implicadas directamente en este proceso. Además, el tratamiento con el ácido okadaico, inhibidor de las proteínas fosfatasa, activa NF- κ B por un proceso independiente de las fosfatasa, pero dependiente de los ROS [195-197], por lo que no hemos podido evaluar el papel concreto de las fosfatasa en la ruta AT₂/NF- κ B.

Otros segundos mensajeros implicados en la activación del receptor AT₂, son las ceramidas [36,241]. Estas proteínas son generadas por degradación de la esfingomielina (por la esfingomielinasa), y actúan vía proteínas G y activación de fosfatasa. Las ceramidas median la activación de NF- κ B y AP-1 inducida por TNF- α e IL-1 β [108,193] y están implicadas en procesos de apoptosis [241]. En nuestros experimentos, empleando un inhibidor de ceramidas (fumosina B), hemos observado que están implicadas en la activación del NF- κ B estimulada por AngII, a través del receptor AT₂ (figura V). Estos datos sugieren un potencial mecanismo de la ruta AT₂/NF- κ B/regulación génica, a través de ROS y ceramidas (figura V).

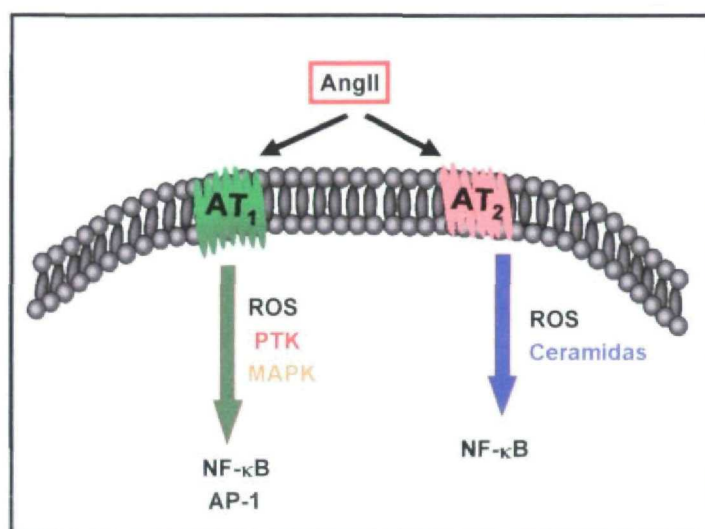


Figura V. Mecanismos intracelulares implicados en la activación de factores de transcripción inducidos por AngII. La estimulación de AT₁ desencadena la activación de ROS, MAPK y PTK mientras que el AT₂ utiliza ROS y ceramidas. Vía AT₁ se activa NF- κ B, mientras que a través del AT₂ se activa AP-1.

La AngII activa AP-1 vía AT₁

Otra importante observación de nuestro trabajo es que el antagonista del AT₁ mejoró las lesiones tubulares en ratas infundidas con AngII. Como se ha comentado anteriormente, el Losartan disminuyó la actividad renal de NF- κ B en túbulo y de AP-1 en glomérulo y túbulo. El efecto en la disminución de NF- κ B se localizó principalmente en las células epiteliales tubulares, y mediante estudios en cultivos, observamos que la AngII activó NF- κ B y AP-1 a través del AT₁. En modelos experimentales de daño renal, los antagonistas AT₁ disminuyeron la fibrosis renal [179,226] y se ha descrito que la infusión sistémica de AngII en ratas se caracteriza por proliferación celular y fibrosis,

precedido de cambios en la expresión de algunos genes regulados por el AP-1, como c-fos, TGF- β y fibronectina [72,104]. En estudios previos, algunos autores han mostrado que en ratas infundidas con AngII, sólo el antagonista del AT₁, y no el del AT₂, reduce la expresión de fibronectina en aorta [245].

El TGF- β posee un papel central en la patogenia de enfermedades renales. La relación entre AngII y TGF β está bien establecida [179]. En células renales, la AngII aumenta TGF- β vía AT₁ [3,4]. En células tubuloepiteliales, la AngII induce hipertrofia celular mediante la producción endógena de TGF- β [4]. El TGF- β está también involucrado en la producción de matriz inducida por AngII en células renales y en modelos de daño renal [179], y es un mediador de la producción del factor de crecimiento CTGF [229]. En nuestro modelo, la AngII aumentó la producción renal y vascular de CTGF, a través del receptor AT₁. Por otro lado, el AP-1 regula genes de proteínas de matriz, como fibronectina, que son inducidos por AngII a través del AT₁. En modelos de nefritis el tratamiento con iECAs o antagonistas AT₁ disminuye la expresión de estos genes [30,179,180]. La AngII aumenta la proliferación de células renales *in vivo* e *in vitro* [3,72]. En nuestro estudio hemos observado que la infusión de AngII aumenta la producción de PTHrP, que es un agente mitogénico en células renales [182]. El tratamiento con el antagonista AT₁ bloqueó la síntesis renal y vascular de PTHrP inducida por AngII. Además por otro lado se ha demostrado ampliamente la relación entre PTHrP y la activación de factor AP-1 [120], y la AngII aumenta la expresión de c-Fos/Jun vía AT₁ en cerebro [230]. Por todo ello podríamos sugerir que el efecto beneficioso del tratamiento del Losartan podría ser debido, al menos en parte, a la regulación de la activación del AP-1 vía AT₁, el cual regula la expresión de genes profibróticos, como TGF- β , fibronectina, CTGF y PTHrP (figura VI).

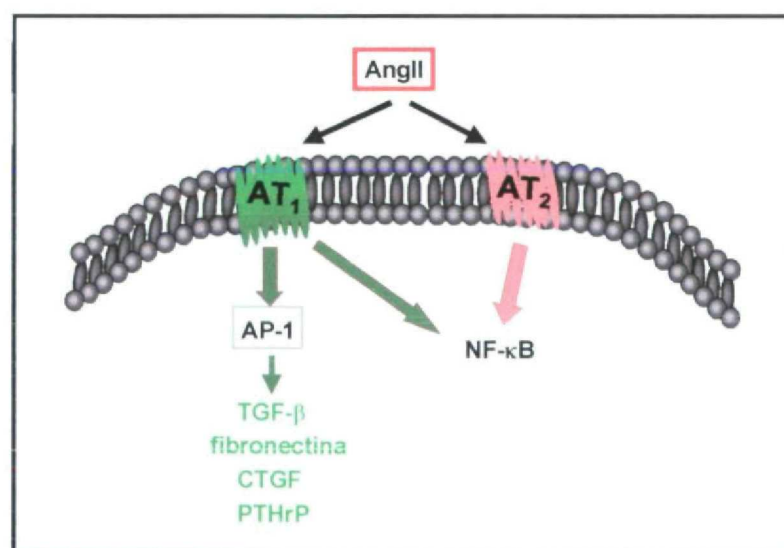


Figura VI. Papel de la ruta AngII/AT₁/AP-1 en el daño tisular. La AngII a través de la ruta AT₁/AP-1 estimula la producción de factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular y agentes mitogénicos. Todos ellos con potencial papel en el daño tisular.

Implicación de otros péptidos del sistema renina-angiotensina (SRA) en el daño tisular

Debido a que en el SRA existen otros productos de degradación con potencial actividad biológica y a que en situaciones de daño tisular existe un aumento de la actividad enzimática del SRA que hace elevar los niveles de los péptidos de degradación [15,252], estudiamos la posible implicación de otros péptidos, que además de la AngII, pudieran jugar un papel activo en situaciones patológicas. En nuestros experimentos, las AngIII, AngIV y Ang(1-7) activaron NF- κ B de modo similar a la AngII, en células circulantes, mesangiales y vasculares, por lo que es probable que a través de este factor, otros metabolitos del SRA puedan estar implicados en procesos de daño renal y vascular. De todos ellos nos centramos en la AngIII y estudiamos su efecto en células mesangiales.

La Angiotensina III está implicada en procesos de inflamación y fibrosis

Mediante experimentos con la AngIII comprobamos que no sólo la AngII posee propiedades profibróticas y proinflamatorias en situaciones de daño renal, sino que la AngIII puede jugar un papel importante en estos procesos:

La AngIII activa el factor nuclear NF- κ B principalmente vía AT₂

En células mesangiales y mononucleares, la AngIII induce la activación, dosis dependiente, del NF- κ B de modo similar a lo observado con la AngII y el TNF- α . Los receptores AT₁ son más sensibles a AngII que a AngIII, pero sin embargo, la afinidad de ambos péptidos por el receptor AT₂ es muy similar [28,29]. Como se ha comentado antes, la mayoría de las acciones de la AngII son mediadas por el receptor AT₁. Algunos efectos de la AngIII también están mediados por el receptor AT₁, como es el caso de la presión de perfusión y la vasoconstricción, y el efecto cronotrópico positivo [15,114]. Ambos receptores, AT₁ y AT₂, están involucrados en la liberación de nitritos por AngII y AngIII en los microvasos, y en la reducción de la actividad de los α -2-adrenoreceptores [45].

Utilizando antagonistas de los receptores, hemos demostrado la importancia del AT₂ en la activación de NF- κ B inducido por AngIII. En células mesangiales, el antagonista AT₂ disminuyó la activación causada por la AngIII con mayor potencia que el del AT₁. Estos datos fueron apoyados por los estudios en células mesangiales y vasculares de ratones AT₁(-/-) donde la activación de NF- κ B por AngIII es mayor que la inducida por la AngII, y el tratamiento con el antagonista AT₂, bloquea este proceso. Además los niveles de degradación de I κ B α fueron correlativos a los de activación de NF- κ B. Todo ello nos indica que al menos *in vitro* la AngIII activa NF- κ B a través de los mismos receptores que la AngII, pero principalmente vía AT₂.

Una posible hipótesis de los efectos beneficiosos de los antagonistas AT₁ podría ser debida al bloqueo de la vía AngII/AT₁ que provoca que la AngII permanezca más tiempo expuesta a sus enzimas degradativas como la APA. Además, esta enzima se encuentra aumentada en situaciones de daño renal donde existe además una activación del SRA (como hipertensión, diabetes, nefritis) [16,17,114], por lo que existe una conversión

mayor de AngII a AngIII, que al no poder unir al receptor AT_1 , interaccionaría con el AT_2 , y puede provocar efectos diferentes. En este sentido se ha demostrado previamente que la producción de NO en riñón está mediada por el AT_2 [36], y como se ha comentado anteriormente, este receptor parece estar implicado en el reclutamiento de células inflamatorias en el riñón. Las diferencias observadas en algunos modelos de daño renal entre iECAs y antagonistas AT_1 podrían deberse a las acciones proinflamatorias de la AngIII, vía $AT_2/NF-\kappa B$.

Del mismo modo los efectos favorables de los iECAs se podrían deber no sólo al bloqueo de las acciones de la AngII o al efecto sobre las bradiquininas y el óxido nítrico, sino además a los efectos de otros metabolitos obtenidos directamente de la AngI, como son AngIII, AngIV y Ang (1-7), que podrían unirse a diferentes receptores de angiotensina, y ser responsables de los efectos beneficiosos del tratamiento con estos fármacos.

La AngIII induce la expresión de Angiotensinógeno

Como ya hemos observado, la AngII estimula la expresión de su propio precursor, el Angiotensinógeno. Además, en células mesangiales mostramos que la AngIII, es capaz de incrementar la expresión de Angiotensinógeno con una potencia similar a la AngII y $TNF-\alpha$. Por este motivo podemos sugerir que no sólo el efector del sistema SRA puede regular su propia síntesis, sino que además, al menos uno de sus metabolitos, la AngIII, puede regenerar este sistema perpetuando de este modo el daño renal (figura VIII).

La AngIII sobreexpresa MCP-1 a través de $NF-\kappa B$

En este trabajo demostramos que en células mesangiales en cultivo la incubación con AngIII causa un incremento dosis-tiempo dependiente de la expresión y producción del MCP-1, de manera similar a lo observado con la AngII y el $TNF-\alpha$, y a través de la activación de $NF-\kappa B$. En células mononucleares, la AngIII también produce un aumento en la expresión de MCP-1 vía $NF-\kappa B$. Estos datos sugieren que no solo la AngII, sino también la AngIII participa en el reclutamiento de células mononucleares a través de la producción de quimioquinas como MCP-1, por las células residentes (mesangiales), y por las propias células circulantes (mononucleares) (figura VII). Además, mediante ensayos de quimiotaxis comprobamos que el MCP-1 inducido por AngIII, es biológicamente activo, y que la propia AngIII produce un efecto directo quimioattractante para monocitos, al igual que sucede con la AngII.

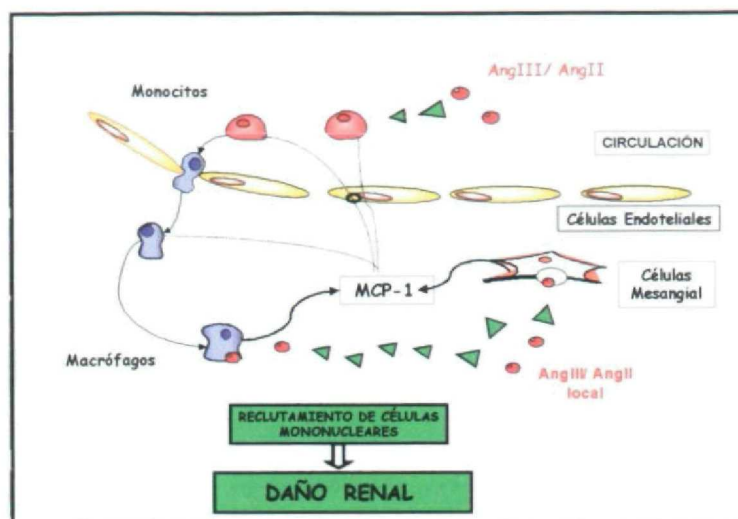


Figura VII. Participación de la AngIII en el reclutamiento celular. La AngIII induce la activación de monocitos y la producción de quimioquinas como MCP-1 (vía NF- κ B) desde monocitos y células mesangiales, de modo similar a la AngII.

La AngIII participa en la proliferación de las células residentes

Se ha demostrado que diversos estímulos inducen rápidamente la transcripción del protooncogén *c-fos* [204,255-256]. Citoquinas como la IL-1 o estímulos externos como la radiación UV, son capaces de estimular la expresión de este gen a través de factores de transcripción como CREB, AP-1, ATF, STAT o SRF [171,233,254]. El papel de la AngII como inductor de hiperplasia/hipertrofia en diversas enfermedades renales es bien conocido [1,3]. La AngII aumenta la expresión génica de *c-fos* en células mesangiales y en riñón [170,204], pero apenas existe información sobre el papel de los productos de degradación de la AngII en este fenómeno.

En el presente trabajo hemos observado que la AngIII induce la expresión del *c-fos* en células mesangiales, de modo similar a la AngII, por lo que podemos deducir que en enfermedades renales que cursan de una elevada síntesis de angiotensinas por activación del SRA, además de la AngII, la AngIII puede inducir la proliferación de células residentes, a través de la sobreexpresión de *c-fos* (figura VIII).

La AngIII contribuye en el acúmulo de matriz extracelular

Como ya hemos comentado existe una gran relación entre AngII y TGF β [179,180]. *In vivo*, la infusión de AngII aumenta la producción de TGF β [103,179], e *in vitro*, diversas células renales incluyendo células mesangiales y tubulares, responden a la AngII aumentando la expresión y síntesis de TGF β [1,179]. Nuestros datos demuestran que también la AngIII induce la expresión de TGF β en células mesangiales de modo similar a la AngII.

La fibronectina es la proteína más representativa del componente de matriz extracelular [164]. En diversos modelos de nefritis, y en respuesta a la infusión sistémica de AngII, se ha observado un aumento de la síntesis de fibronectina [164,245]. En este trabajo, en células mesangiales la AngIII estimula la producción de

fibronectina de modo similar a lo que ocurre con la AngII. Estos datos sugieren que no sólo la AngII, sino también su metabolito, la AngIII, contribuye a la producción de matriz extracelular a través de la generación autocrina de TGF- β y producción de componentes de matriz extracelular como la fibronectina (figura VIII).

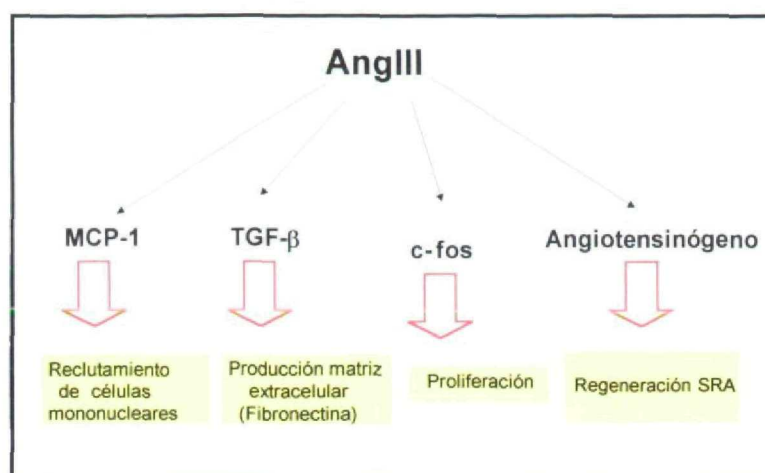


Figura VIII. Papel de la AngIII en procesos de daño renal. La AngIII interviene en diversos procesos que cursan el daño renal: en el reclutamiento celular, mediante la producción de quimioquinas, en fibrosis, aumentado la expresión y producción de TGF- β y fibronectina, en la proliferación celular, a través de la expresión de c-fos, y en la regeneración del SRA, al autorregular su propia síntesis mediante la sobreexpresión de Angiotensinógeno.

En resumen, todos nuestros datos proporcionan nuevos datos de los péptidos de degradación del SRA describiendo importantes funciones a nivel renal hasta ahora desconocidas, particularmente para la AngIII. Aunque serían necesarios más estudios sobre los efectos de la AngIII *in vivo* en el riñón, podemos sugerir que además de la AngII, la AngIII podría tener un papel potencial en procesos de reclutamiento, proliferación y fibrosis en situaciones de daño renal (figura VIII).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Estudios *In vivo*:

Mediante la infusión de Ang II en ratas normotensas hemos demostrado que:

- La AngII de manera directa causa a nivel renal atrofia tubular y fibrosis, a través del receptor AT₁, e infiltración de células inflamatorias, vía AT₂.
- La AngII aumenta la actividad de los factores de transcripción NF-κB y AP-1 implicados en el daño tisular. El NF-κB en riñón se localizó en células glomerulares, túbulointersticiales e infiltrantes, mientras que AP-1 se ubicó en áreas glomerulares y túbulointersticiales. En aorta se detectó NF-κB activado en células endoteliales y de músculo liso vascular.
- En riñón, la AngII activa NF-κB a través de AT₁ y AT₂, mientras que la activación del AP-1 se realiza vía AT₁.
- Además, la AngII es capaz de estimular en riñón y aorta la producción de proteínas involucradas en daño tisular, como citoquinas proinflamatorias (TNF-α), factores de crecimiento (CTGF), y agentes mitogénicos (PTHrP).

Estudios *In vitro*:

- La AngII es capaz de activar los factores NF-κB y AP-1 en células renales (mesangiales y tubulares), de músculo liso vascular y mononucleares.
- La AngII utiliza ambos receptores AT₁ y AT₂ en la activación de NF-κB, sin embargo sólo el AT₁ en la activación de AP-1.
- En la estimulación de NF-κB por AngII se encuentran implicados diversos mediadores intracelulares, dependiendo del receptor utilizado. La ruta AT₁/NF-κB está mediada por activación de proteínas quinasas y radicales de oxígeno, y la ruta AT₂/NF-κB, por radicales de oxígeno y ceramidas, mientras que la activación de PKC no está involucrada en ninguno de los dos receptores.
- La AngII, vía AT₁, y a través de NF-κB, causa sobreexpresión de genes implicados en el daño tisular, como la quimioquina MCP-1 y el precursor del SRA, el Angiotensinógeno. El MCP-1 era biológicamente activo puesto que mostró actividad quimioattractante para monocitos en sobrenadantes de células mesangiales. La estimulación de Angiotensinógeno sugiere la existencia de un círculo vicioso en la generación local de AngII.
- Además de la AngII, otros péptidos del SRA, como son AngIII, AngIV y Ang(1-7) estimulan la activación de NF-κB en células renales, circulantes y vasculares.
- Profundizando en el efecto de la AngIII en células mesangiales, observamos que este péptido activa NF-κB principalmente a través del receptor AT₂. Además, la AngIII está implicada en procesos de reclutamiento, proliferación y fibrosis, mediante la producción de MCP-1, c-fos y TGF-β, respectivamente. Al igual que la AngII es capaz de regenerar el SRA a través de la sobreexpresión de Angiotensinógeno.

En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que la AngII (y su péptido de degradación, la AngIII), además de ser potentes agentes vasoactivos, poseen propiedades proinflamatorias.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Dzau VJ: Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 1988;77:1-4
2. Mulrow PJ: The intrarenal renin-angiotensin system. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 1993;2:41-44
3. Egidio J: Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int.* 1996;49:578-597
4. Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a renal growth factor. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1993;3:1531-1540
5. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egidio J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in the kidney through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 gene expression. *J Immunol.* 1998, 161:430-439
6. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52:11-34.
7. Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen and gene transcription. *Hypertension* 1996;27: 465-475.
8. Borland JA, Chester AH, Rooker SJ, Wharton J, Davie N, Amrani M, Yacoub MH: Expression and function of angiotensin converting enzyme, chymase, and angiotensin II in the human radial artery and internal thoracic artery. *Ann.Thorac.Surg.*2000.Dec. 70.(6.):2054.-63.
9. Jones CA, Hurley MI, Black TA, Kane CM, Pan L, Pruitt SC, Gross KW: Expression of a renin/GFP transgene in mouse embryonic, extra-embryonic, and adult tissues. *Physiol. Genomics* 2000.Nov.9.;4.(1.):75.-81.
10. Wachsmuth ED, Woodhams R: Uniform distribution and concentration of aminopeptidase in proximal tubules of pig kidney. *J.Histochem.Cytochem.* 1973; 21:685-692

11. Dendorfer A, Wolfrum S, Wagemann M, Qadri F, Dominiak P: Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. *Am.J.Physiol.HeartCirc.Physiol.* 2001 .May.; 280.(5.): H2182.-8.
12. Gómez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzabertia F, Egido J: Activation of nf-kappab in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria : role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension*. 2001. Apr;37(4):1171-8.
13. King SJ, Oparil S: Converting-enzyme inhibitors increase converting-enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 1992;263:C743-C749.
14. Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, Riegger G, Lorell BH: Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II. *Circ.Res.* 1995;76:489-497.
15. Ardaillou R, Chansel D: Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int.* 1997;52:1458-1468.
16. Wolf G, Thaiss F, Disser N, Pooth R, Zahner G, Stahl RA: Glomerular mRNA expression of angiotensinase A after renal ablation. *Exp Nephrol.* 1995 Jul-Aug;3(4):240-8.
17. Thaiss F, Wolf G, Assad N, Zahner G, Stahl RA: Angiotensinase A gene expression and enzyme activity in isolated glomeruli of diabetic rats. *Diabetologia* 1996;39:275-280
18. Sim MK: Degradation of angiotensin I in the endothelium and smooth muscle of the rat aorta. *Biochem.Pharmacol.* 1993;45:1524-1527
19. Cermak R, Kleta R, Forssmann WG, Schlatter E: Natriuretic peptides increase a K+ conductance in rat mesangial cells. *Pflugers Arch.* 1996;431:571-577
20. Brunkhorst R, Wrenger E, Kuhn K, Schmidt FW, Koch K: Effect of captopril therapy on sodium and water excretion in patients with liver cirrhosis and ascites. *Klin. Wochenschr.* 1989;67:774-783

21. Zeng GB: The renin-angiotensin-aldosterone system changes in chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua*. 1989;12:265-7, 317
22. Danser AH: Local renin-angiotensin systems. *Mol.Cell Biochem*. 1996;157:211-216
23. Korner PI: Cardiovascular hypertrophy and hypertension: causes and consequences. *Blood Press.Suppl*. 1995;2:6-16.
24. Unger T, Gohlke P, Ganten D, Lang RE: Converting enzyme inhibitors and their effects on the renin-angiotensin system of the blood vessel wall. *J.Cardiovasc. Pharmacol*. 1989;13 Suppl 3:S8-16.:S8-16
25. Lee AF, MacFadyen RJ, Struthers AD: Neurohormonal reactivation in heart failure patients on chronic ACE inhibitor therapy: a longitudinal study. *Eur.J.Heart Fail*. 1999;1:401-406.
26. Zhang W, Huang BS, Leenen FH: Brain renin-angiotensin system and sympathetic hyperactivity in rats after myocardial infarction. *Am.J.Physiol*. 1999;276:H1608-H1615
27. Ponchon P, Elghozi JL: Hormonal contribution to short-term variability of blood pressure in a renovascular hypertension model. *Arch.Mal.Coeur.Vaiss*. 1995;88:1203-1207
28. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol.Rev*. 1993;45:205-251
29. Chung O, Kuhl H, Stoll M, Unger T: Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int.Suppl*. 1998;67:S95-9
30. Goto M, Mukoyama M, Suga S, Matsumoto T, Nakagawa M, Ishibashi R, Kasahara M, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K: Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension* 1997;30:358-362
31. Chai SY, Bastias MA, Clune EF, Matsacos DJ, Mustafa T, Lee JH, McDowall SG, Mendelsohn FA, Albiston AL, Paxinos G: Distribution of angiotensin IV binding sites

(AT₄ receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. *J.Chem.Neuroanat.*2000.Dec.;20.(3.-4.):339.-48.

32. Buczek W, Kucharewicz I: Angiotensin-(1-7). One step forward?
*Pol.J.Pharmacol.*2000.Mar.-Apr.;52.(2.):75.-81

33. Speth RC, Kim KH: Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine⁶ angiotensin II.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 1990;169:997-1006

34. Bihoreau C, Monnot C, Davies E, Teutsch B, Bernstein KE, Corvol P, Clauser E: Mutation of Asp74 of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes G-protein coupling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993;90:5133-5137

35. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T: Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J.Biol.Chem.* 1993;268:24543-24546

36. Matsubara H: Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ.Res.* 1998;83:1182-1191

37. Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Iwasaka T, Inada M: Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation* 1997;96:3954-3962

38. Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM: Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 1997; 30: 1238-1246

39. Siragy HM, Inagami T, Ichiki T, Carey RM: Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999;96:6506-6510

40. Bernstein KE, Alexander RW: Counterpoint: molecular analysis of the angiotensin II receptor. *Endocr.Rev.* 1992;13:381-386

41. Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T: Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 1999;26:544-549
42. Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K: Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1992;188:446-452
43. Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH: Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension* 1995;26:164-170
44. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT: Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1994;26:809-820
45. Yang CH, Shyr MH, Tan PP, Chan SH: Participation of AT1 and AT2 receptors in the differential interaction between angiotensin II or III and alpha-2 adrenoceptors in the nucleus reticularis gigantocellularis in cardiovascular regulation and antinociception in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996;279:795-802
46. Sabri A, Levy BI, Poitevin P, Caputo L, Faggin E, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL: Differential roles of AT1 and AT2 receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler. Thromb.Vasc.Biol.* 1997;17:257-264
47. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL: Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J.Clin.Invest.* 1996;98:418-425
48. Ardaillou R: Angiotensin II receptors. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1999;10 Suppl 11:S30-9.
49. Liu KL, Lo M, Grouzmann E, Mutter M, Sassard J: The subtype 2 of angiotensin II receptors and pressure-natriuresis in adult rat kidneys. *Br.J.Pharmacol.* 1999;126:826-832
50. Stroth U, Unger T: The renin-angiotensin system and its receptors. *J.Cardiovasc. Pharmacol.* 1999;33 Suppl 1:S21-8; discussion S41-3.:S21-S28

51. Stoll U, Meffer S, Stroth U, Unger T: Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. *J. Hypertens.* 1995;13:1529-1534.
52. Luque M, Martin P, Martell M, Fernández C. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens.* 1996 Jun;14(6):799-805.
53. Stanziola L, Greene LJ, Santos RA: Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on angiotensin I and bradykinin metabolism in rats. *Am.J.Hypertens.* 1999;12:1021-1029
54. Weir MR, Dzau VJ: The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am.J.Hypertens.* 1999;12:205S-213S
55. Morrissey JJ, Klahr S: Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule synthesis. *Am.J.Physiol.* 1998;274:F580-F586
56. Morrissey JJ, Klahr S: Rapid communication. Enalapril decreases nuclear factor kappa B activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1997;52:926-933
57. Tanabe A, Naruse M, Naruse K, Yoshimoto T, Tanaka M, Mishina N, Imaki T, Sugaya K, Miyazaki H, Demura H: Angiotensin II receptor subtype in human adrenal glands. *Nippon.Rinsho.* 1999;57:1042-1048
58. Kalkbrenner F, Dippel E, Schroff M, Wittig B, Schultz G: Nuclear application of antisense oligonucleotides by microinjection and ballistomagnetic transfer to identify G protein heterotrimers activating phospholipase C. *Methods Mol.Biol.* 1997;83:203-16
59. Suzuki S, Ebihara I, Tomino Y, Koide H: Transcriptional activation of matrix genes by transforming growth factor beta 1 in mesangial cells. *Exp.Nephrol.* 1993;1:229-237
60. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I: The progression renal disease. *N Engl.J.Med* 1998; 318:1657-1666.

61. Rovin BH, Lu L, Marsh CB: Lymphocytes induce monocyte chemoattractant protein-1 production by renal cells after Fc gamma receptor cross-linking: role of IL-1beta. *J.Leukoc.Biol.*2001.Mar.;69.(3.):435.-9. 69:435-439
62. Struzt F. Novel aspects of renal fibrogenesis. *Nephrol Dial Transplant*: 1995;10: 1526-1532
63. Stockand JD, Sansom SC: Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol.Rev.* 1998;78:723-744
64. L'Azou B, Medina J, Frieauff W, Cordier A, Cambar J, Wolf A: In vitro models to study mechanisms involved in cyclosporine A-mediated glomerular contraction. *Arch.Toxicol.* 1999;73:337-345
65. Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R: Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*2000.Sep.21.;58.(Suppl.77.):93.-98
66. Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts *Kidney Int.* 1997; 52:1497-1510
67. el-Dahr SS, Dipp S, Yosipiv IV, Baricos WH: Bradykinin stimulates c-fos expression, AP-1-DNA binding activity and proliferation of rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1996;50:1850-1855
68. Egido J, Hernández-Presa MA, Tuñón J: Transcription factor kappa-B and cardiovascular disease. *Cardiovasc.RiskFactor* 2000; 99:159-168.
69. Schlondorff D: The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. *Kidney Int.Suppl.* 1995;49:S44-7
70. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95:1532-1541

71. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 1998;83:952-959
72. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM: Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992;19:464-474
73. Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ: Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* 2000.Oct.24.;102.(17.): 2118.-23.
74. Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA: Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J.Clin.Invest.* 1997;100:1047-1058
75. Farber HW, Center DM, Rounds S, Danilov SM: Components of the angiotensin system cause release of a neutrophil chemoattractant from cultured bovine and human endothelial cells. *Eur.Heart J.* 1990;11 Suppl B:100-7
76. Weinstock JV, Kassab JT: Angiotensin II stimulation of granuloma macrophage phagocytosis and actin polymerization in murine schistosomiasis mansoni. *Cell Immunol.* 1984;89:46-54
77. Chisi JE, Wdzieczak-Bakala J, Thierry J, Briscoe CV, Riches AC: Captopril inhibits the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in murine long-term bone marrow cultures. *Stem.Cells* 1999;17:339-344
78. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, Ruiz P, Smithies O, Coffman TM: Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J.Clin.Invest.* 1999;104:1693-1701
79. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D: Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995;25:913-917

80. Mene P, Fais S, Cinotti GA, Pugliese F, Luttmann W, Thierauch KH: Regulation of U-937 monocyte adhesion to cultured human mesangial cells by cytokines and vasoactive agents. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1995; 10:481-489
81. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL: Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1996;226:862-868
82. Krejcy K, Eichler HG, Jilma B, Kapiotis S, Wolzt M, Zanaschka G, Gasic S, Schutz W, Wagner O: Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leukocyte count in vivo. *Can.J.Physiol. Pharmacol.* 1996;74:9-14
83. Ricardo SD, Levinson ME, DeJoseph MR, Diamond JR: Expression of adhesion molecules in rat renal cortex during experimental hydronephrosis. *Kidney Int.* 1996;50:2002-2010
84. Mervaala EM, Muller DN, Park JK, Schmidt F, Lohn M, Breu V, Dragun D, Ganten D, Haller H, Luft FC: Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 1999;33:389-395
85. Luft FC, Mervaala E, Muller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H: Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999;33:212-218
86. Drexler H, Kurz S, Jeserich M, Munzel T, Hornig B: Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with chronic heart failure. *Am.J.Cardiol.* 1995;76:13E-18E
87. Gasic S, Wagner OF, Fasching P, Ludwig C, Veitl M, Kapiotis S, Jilma B: Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients with microalbuminuria. *Am.J.Hypertens.* 1999;12:217-222
88. Strawn WB, Gallagher PE, Tallant EA, Ganten D, Ferrario CM: Angiotensin II AT1-receptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)27 rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1999;33:341-351
89. Gonzalez-Cuadrado S, Bustos C, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Guijarro C, Plaza JJ, Egido J: Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-

regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin.Exp.Immunol.* 1996;106:518-522

90. Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Egido J: ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am.J.Pathol.* 1998;153:1825-1837

91. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, Egido J: Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999;147:253-261

92. Schindler R, Dinarello CA, Koch KM: Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 1995;7:526-533

93. Papapetropoulos A, Antonov A, Virmani R, Kolodgie FD, Munn DH, Marczin N, Ryan JW, Gerrity RG, Catravas JD: Monocyte- and cytokine-induced downregulation of angiotensin-converting enzyme in cultured human and porcine endothelial cells. *Circ.Res.* 1996;79:512-523

94. Dorffle Y, Latsch C, Stuhlmuller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J: Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999;34:113-117

95. Nakamura A, Johns EJ, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T: Effect of beta(2)-adrenoceptor activation and angiotensin II on tumour necrosis factor and interleukin 6 gene transcription in the rat renal resident macrophage cells. *Cytokine.* 1999;11:759-765

96. Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K, Takeshita A. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999 Jul;34(1):118-25.

97. Han Y, Runge MS, Brasier AR: Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ.Res.* 1999;84:695-703

98. Peeters AC, Netea MG, Kullberg BJ, Thien T, van der Meer JW: The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production. *Immunology* 1998;94:376-379
99. Constantinescu CS, Goodman DB, Ventura ES: Captopril and lisinopril suppress production of interleukin-12 by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol.Lett.* 1998;62:25-31
100. Wawrocka-Pawlak M, Dabrowski R: The effect of captopril on histamine release from purified rat mast cells. *Inflamm.Res.* 1999;48:262-264
101. Watanabe T, Saiki Y, Sakata Y: The effect of central angiotensin II receptor blockade on interleukin-1 β - and prostaglandin E-induced fevers in rats: possible involvement of brain angiotensin II receptor in fever induction. *J.Pharmacol.Exp. Ther.* 1997;282:873-881
102. Kopnisky KL, Sumners C, Chandler LJ: Cytokine- and endotoxin-induced nitric oxide synthase in rat astroglial cultures: differential modulation by angiotensin II. *J.Neurochem.* 1997;68:935-944
103. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J.Clin.Invest.* 1994;93:2431-2437
104. Mai M, Geiger H, Hilgers KF, Veelken R, Mann JFE, Dämmrich J, Luft F. Early interstitial changes in hypertension-induced renal injury. *Hypertension* 1993, 22:754-765.
105. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H: Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000.Mar.28.;101.(12.):1372-8.
106. Fukuhara M, Geary RL, Diz DI, Gallagher PE, Wilson JA, Glazier SS, Dean RH, Ferrario CM: Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension* 2000.Jan.;35.(1.Pt.2.):353-9

107. Takagishi T, Murahashi N, Azagami S, Morimatsu M, Sasaguri Y: Effect of angiotensin II and thromboxane A₂ on the production of matrix metalloproteinase by human aortic smooth muscle cells. *Biochem.Mol.Biol. Int.* 1995;35:265-273
108. Sawai H, Okazaki T, Domae N: Ceramide: a lipid mediator of apoptotic signal transduction. *Nippon.Rinsho.* 1996;54:1803-1808
109. Clozel M: Mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors on endothelial function in hypertension. *Hypertension* 1991;18:II37-II42
110. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM: Inhibition of early atherogenesis by Losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 2000.Apr.4.;101.(13.):1586.-93.
111. Fennessy PA, Campbell JH, Mendelsohn FA, Campbell GR: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and atherosclerosis: relevance of animal models to human disease. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 1996;23:S30-S32
112. Blair-West JR, McKenzie JS, McKinley MJ: The actions of angiotensin II on the isolated portal vein of the rat. *Eur.J.Pharmacol.* 1971;15:221-230
113. Liu KL, Sassard J, Benzoni D: In the Lyon hypertensive rat, renal function alterations are angiotensin II dependent. *Am.J.Physiol.* 1996;271:R346-R351
114. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C: Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996;93:11968-11973
115. Song L, Healy DP: Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. *Hypertension* 1999;33:746-752
116. Juillerat-Jeanneret L, Lohm S, Hamou MF, Pinet F: Regulation of aminopeptidase A in human brain tumor vasculature: evidence for a role of transforming growth factor-beta. *Lab.Invest.* 2000.Jun.;80.(6.):973.-80

117. Blume A, Herdegen T, Unger T: Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J.Mol.Med.* 1999;77:339-357
118. Seikaly MG, Arant BS, Seney FD: Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J.Clin.Invest.* 1990;86:1352-1357
119. Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Lusis AJ: Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J.Clin.Invest.* 1993;91:2572-2579
120. Ionescu AM, Schwarz EM, Vinson C, Puzas JE, Rosier R, Reynolds PR, O'Keefe RJ: PTHrP Modulates Chondrocyte Differentiation through AP-1 and CREB Signaling. *J.Biol.Chem.* 2001.Apr.13.;276.(15.):11639.-47
121. Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M, Largo R, Lopez-Armada MJ, Plaza JJ, Gonzalez E, Egido J: Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension* 1996;27:885-892
122. Nishiura T, Nishimura T, deSerres S, Godfrey V, Bradham CA, Nakagawa T, Brenner DA, Meyer AA: Gene expression and cytokine and enzyme activation in the liver after a burn injury. *J.Burn.Care Rehabil.* 2000.Mar.-Apr.;21.(2.):135.-41
123. Carey HV, Frank CL, Seifert JP: Hibernation induces oxidative stress and activation of NK-kappaB in ground squirrel intestine. *J.Comp.Physiol. [B.]* 2000. Nov.;170.(7.):551.-9
124. Yan SF, Pinsky DJ, Mackman N, Stern DM: Egr-1: is it always immediate and early? *J.Clin.Invest.* 2000.Mar.;105.(5.):553.-4
125. Saadane N, Alpert L, Chalifour LE: TAFII250, Egr-1, and D-type cyclin expression in mice and neonatal rat cardiomyocytes treated with doxorubicin. *Am.J.Physiol.* 1999;276:H803-H814
126. Corbucci GG: Adaptive changes in response to acute hypoxia, ischemia and reperfusion in human cardiac cell. *Minerva.Anesthesiol.* 2000.Jul.-Aug.;66.(7.-8.):523.-30



127. Clemens JA: Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. *Free Radic.Biol.Med.*2000. May. 15.; 28.(10.):1526-31
128. Doi T: The contribution of mesangial cell proliferation to progressive glomerular injury. *J.Med.Invest.*2001.Feb.;48.(1-2.):1-4.
129. Motojima M, Ando T, Yoshioka T: Sp1-like activity mediates angiotensin-II-induced plasminogen-activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene expression in mesangial cells. *Biochem.J.*2000.Jul.15.;349.(Pt.2.):435-41.
130. Rupprecht HD, Dann P, Sukhatme VP, Sterzel RB, Coleman DL: Effect of vasoactive agents on induction of Egr-1 in rat mesangial cells: correlation with mitogenicity. *Am.J.Physiol.* 1992;263:F623-F636
131. Lelkes Pi, Hahn KL: On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. *Adv.Exp.Med.Biol.*1998; 454:295-310.
132. Largo R, Gomez-Garre D, Santos S, Penaranda C, Blanco J, Esbrit P, Egido J: Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int.* 1999;55:82-90
133. Nahman NS, Rothe KL, Falkenhain ME, Frazer KM, Dacio LE, Madia JD, Leonhart KL, Kronenberger JC, Stauch DA: Angiotensin II induction of fibronectin biosynthesis in cultured human mesangial cells: association with CREB transcription factor activation. *J.Lab.Clin.Med.* 1996;127:599-611
134. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE: Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995;375:247-250
135. Badou A, Bennasser Y, Moreau M, Leclerc C, Benkirane M, Bahraoui E: Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *J.Virol.* 2000 Nov.;74.(22.):10551-62
136. Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Cancelas P, Gomez-Gerique J, Millan J, Egido J: Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy

volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 2000;Aug.29.;102.(9.):1020.-6

137. Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matsuzawa Y: Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*2000;Aug.;20.(8.):1953.-60

138. Moussad EE, Brigstock DR: Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol.Genet.Metab.*2000.Sep.-Oct.;71.(1.-2.):276.-92

139. Rangan GK, Wang Y, Tay YC, Harris DC: Inhibition of NFkappaB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *Am.J.Physiol.* 1999;277:F779-F789

140. Schawalder A, Oertli B, Beck-Schimmer B, Wuthrich RP: Regulation of hyaluronan-stimulated VCAM-1 expression in murine renal tubular epithelial cells. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1999;14:2130-2136

141. Shurman L, Sen R, Bergman Y: Adenovirus E1A products activate the Ig k-chain enhancer in fibroblasts. A possible involvement of the NF-kB binding site. *J.Immunol.* 1989;143:3806-3812

142. Chen FE, Ghosh G: Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 1999;18:6845-6852

143. Schmitz ML, Baeuerle PA: The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.* 1991;10:3805-3817

144. Perkins ND: The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends.Biochem.Sci.* 2000.Sep.;25.(9.):434.-40

145. Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiersa W, Haegeman G: p38 and extralellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are requiered for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J.Biol.Chem.* 1998;Feb 6;273 (6): 3285-90

146. Li J, Brasier AR: Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the rel A (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol.Endocrinol.* 1996;10:252-264
147. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC: NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000;Jan.;35.(1.Pt.2.):193
148. Karin M, Liu Z, Zandi E: AP-1 function and regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1997;9:240-246
149. Hamaguchi A, Kim S, Yano M, Yamanaka S, Iwao H: Activation of glomerular mitogen-activated protein kinases in angiotensin II-mediated hypertension. *J.Am. Soc.Nephrol.* 1998;9:372-380
150. Ortiz A, Alonso J, Gomez-Chiarri M, Lerma JL, Seron D, Condom E, Gonzalez E, Egido J: Fibronectin (FN) decreases glomerular lesions and synthesis of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), platelet-activating factor (PAF) and FN in proliferative glomerulonephritis. *Clin.Exp.Immunol.* 1995;101:334-340
151. Karin M: The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* 1995;270:16483-16486
152. Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim.Biophys.Acta* 1991;1072:129-157
153. Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR: Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur.J.Immunol.* 1997;27:1091-1097
154. Gomez-Guerrero C, Gonzalez E, Egido J: Evidence for a specific IgA receptor in rat and human mesangial cells. *J.Immunol.* 1993;151:7172-7181
155. Mene P, Simonson MS, Dunn MJ: Physiology of the mesangial cell. *Physiol.Rev.* 1989;69:1347-1424

156. Macari D, Whitebread S, Cumin F, De Gasparo M, Levens N: Renal actions of the angiotensin AT₂ receptor ligands CGP 42112 and PD 123319 after blockade of the renin-angiotensin system. *Eur.J.Pharmacol.* 1994;259:27-36
157. Wookey PJ, Cao Z, Cooper ME: Interaction of the renal amylin and renin-angiotensin systems in animal models of diabetes and hypertension. *Miner.Electrolyte Metab.* 1998;24:389-399
158. Cervenka L, Mitchell KD, Navar LG: Renal function in mice: effects of volume expansion and angiotensin II. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1999;10:2631-2636
159. Fan L, Mukaddam-Daher S, Javeshghani D, Quillen E, Gutkowska J: Renal effects of prolonged intrarenal infusions of angiotensin II and atrial natriuretic peptide in sheep. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1999;34:427-433
160. Campbell SE, Janicki JS, Weber KT: Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1995;27:1545-1560
161. Sun Y, Ramires FJ, Weber KT: Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc.Res.* 1997;35:138-147
162. Greene AS: Life and death in the microcirculation: a role for angiotensin II. *Microcirculation.* 1998;5:101-107
163. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL: Effects of AT₁ and AT₂ angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 1998;31:487-492
164. Ruiz-Ortega, González S, Seron D, Condom E, Bustos C, Largo R., González E and Egido J. ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis. *Kidney Int.* 1995;48:1778-1791.
165. Hernandez-Presa MA, Gomez-Guerrero C, Egido J: In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int.* 1999;55:209-214

166. Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J.Immunol.Methods* 1980;33:239-247
167. Cross AK, Richardson V, Ali SA, Palmer I, Taub DD, Rees RC: Migration responses of human monocytic cell lines to alpha- and beta-chemokines. *Cytokine*. 1997;9:521-528
168. Rovin BH, Yoshiumura T, Tan L: Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J.Immunol*. 1992; 148:2148-2153
169. Takasaki I, Chobanian AV, Brecher P: Biosynthesis of fibronectin by rabbit aorta. *J.Biol.Chem*. 1991;266:17686-17694
170. Otsuka F, Yamauchi T, Ogura T, Takahashi M, Kageyama J, Makino H: Renal c-fos expression induced by angiotensin II is enhanced in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 1998;63:2089-2095
171. Blume A, Seifert K, Lebrun CJ, Mollenhoff E, Gass P, Unger T, Herdegen T: Differential time course of angiotensin-induced AP-1 and Krox proteins in the rat lamina terminalis and hypothalamus. *Neurosci.Lett*. 1998;241:87-90
172. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM: Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992;19:464-474
173. Ashizawa M, Miyazaki M, Koji T, Isomoto H, Ozono Y, Harada T, Yagame M, Endoh M, Kurokawa K, Sakai H, Kohno S: Expression of Nuclear Factor Kappa (NF-(k)B). Assessed by Southwestern Histochemistry (SWH). Is associated with renal injury in IgA Nephropathy (IgAN). *J. Am. Soc. Nephrol*. 1999;10:95^a (Abstr).
174. Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T: Activation of transcription factor NF-kappa B in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochim. Biophys.Acta* 1996;1316:132-138
175. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D: Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is

present in the atherosclerotic lesion. *J.Clin.Invest.* 1996;97:1715-1722

176. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB: Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler.Thromb. Vasc.Biol.* 2000.Mar.;20.(3.):645.-51

177. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR: Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.* 2000. Oct.;58.(4.):1389.-99

178. Yamamoto T, Eckes B, Krieg T: Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin mRNAs in human skin fibroblasts. *Arch.Dermatol. Res.* 2000.Nov.;292.(11.):556.-61

179. Border WA, Noble NA: Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998;31:181-188

180. Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE: Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int.* 1997;51:1553-1567

181. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG: Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2000. Jan.;11.(1.):25.-38

182. Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, Soifer N, Judes C, Helwig JJ: Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int.* 1996;50:1591-1603

183. Garcia SI, Clemens TL, Fagin JA, Finkielman S, Pirola CJ: Parathyroid hormone-related protein expression in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats: evidence for lack of response to angiotensin II. *J.Hypertens.* 1998;16:1467-1474

184. Dzau VJ, Gibbons GH: Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension. *Hypertension* 1991;18:III115-III121

185. Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J.Biol.Chem.* 2001;Apr.13.;276.(15.):12440-8
186. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM: Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:1223-1229
187. Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M: Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 1995;269:L829-L836
188. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W: Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1999;257:826-828
189. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennesy PA, Higaki J, Ogihara T: Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J.Hypertens.* 1999;17:537-545
190. Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P: Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension* 1994;24:531-537
191. Baeuerle PA, Baltimore D: I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 1988;242:540-546
192. Beauparlant P, Hiscott J: Biological and biochemical inhibitors of the NF-kappa B/Rel proteins and cytokine synthesis. *Cytokine.Growth Factor.Rev.* 1996;7:175-190
193. Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M: TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992;71:765-776
194. Meichle A, Schutze S, Hensel G, Brunsing D, Kronke M: Protein kinase C-independent activation of nuclear factor kappa B by tumor necrosis factor.

J.Biol.Chem. 1990;265:8339-8343

195. Suzuki YJ, Mizuno M, Packer L: Signal transduction for nuclear factor-kappa B activation. Proposed location of antioxidant-inhibitable step. *J.Immunol.* 1994; 153:5008-5015

196. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA: Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J.Exp.Med.* 1992;175:1181-1194

197. Schmidt KN, Traenckner EB, Meier B, Baeuerle PA: Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J.Biol. Chem.* 1995;270:27136-27142

198. Terui J, Tamoto K, Sudo J: Proteinuric potentials of angiotensin II, [des-Asp1]-angiotensin II, and [des-Asp1, des-Arg2]-angiotensin II in rats. *Biol.Pharm.Bull.* 1994; 17:1516-1518

199. Yamamoto Y, Yamamguchi T, Shimamura M, Hazato T: Angiotensin III is a new chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1993;193:1038-1043

200. Hanesworth JM, Sardinia MF, Krebs LT. Elucidation of a specific binding site for angiotensin II(3-8), angiotensin IV, in mammalian heart membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Aug;266(2):1036-42.

201. Duque N, Gomez-Guerrero C, Egido J: Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J.Immunol.* 1997;159:3474-3482

202. Brasier AR, Li J: Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension* 1996;27:465-475

203. Tsuda T, Hamamori Y, Yamashita T, Fukumoto Y, Takai Y: Involvement of three intracellular messenger systems, protein kinase C, calcium ion and cyclic AMP, in the regulation of c-fos gene expression in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 1986;208:39-42

204. Ingram AJ, Ly H, Thai K, Kang MJ, Scholey JW: Mesangial cell signaling cascades in response to mechanical strain and glucose. *Kidney Int.* 1999;56:1721-1728
205. Garcia-Sainz JA, Garcia-Caballero A, Gonzalez-Espinosa C: Angiotensin AT1 receptors in Clone 9 rat liver cells: Ca²⁺ signaling and c-fos expression. *Eur.J. Pharmacol.* 1998;362:235-243
206. Kaname S: TGF-beta gene expression in mesangial cells. *Nippon.Rinsho.* 1992;50:3027-3031
207. Border WA, Ruoslahti E: Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J.Clin.Invest.* 1992;90:1-7
208. Liao HS, Matsumoto A, Itakura H, Doi T, Honda M, Kodama T, Geng YJ: Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999;19:1872-1880
209. Wang Y, Prywes R: Activation of the c-fos enhancer by the erk MAP kinase pathway through two sequence elements: the c-fos AP-1 and p62TCF sites. *Oncogene* 2000;Mar.9.;19.(11.):1379.-85
210. Kim S, Iwao H: Activation of mitogen-activated protein kinases in cardiovascular hypertrophy and remodeling. *Jpn.J.Pharmacol.* 1999;80:97-102
211. Kumar SN, Boss JM: Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1. *Mol.Immunol.* 2000;Aug.;37.(11.):623.-32
212. Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ: Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* 1994;347:178-180
213. Mene P, Pugliese F, Cinotti GA: Adhesion of U-937 monocytes induces cytotoxic damage and subsequent proliferation of cultured human mesangial cells. *Kidney Int.* 1996;50:417-423
214. Capers Q, Alexander RW, Lou P, De Leon H, Wilcox JN, Ishizaka N, Howard AB, Taylor WR: Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of

hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:1397-1402

215. Clozel M, Khun H, Bauntgartner HR: ACE inhibition and the vascular intima in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 4:S15-8. Review

216. Bush E, Maeda N, Kuziel WA, Dawson TC, Wilcox JN, DeLeon H, Taylor WR: CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 2000.Sep.; 36.(3.):360.-3

217. Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T: Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2000. Jan.;35.(1.Pt.1.):68.-75

218. Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1994 Jul;14(7):1021-31.

219. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P: Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am.J.Pathol.* 1999;155:1281-1291

220. Ishizaka N, Nakao A, Ohishi N, Suzuki M, Aizawa T, Taguchi J, Nagai R, Shimizu T, Ohno M: Increased leukotriene A(4) hydrolase expression in the heart of angiotensin II-induced hypertensive rat. *FEBS Lett.* 1999;463:155-159

221. Andersen S, Tarnow L, Rossing P, Hansen BV, Parving HH: Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int.*2000.Feb.; 57.(2.):601.-6

222. Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky MS, Moore LC: AT1 receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1999;10 Suppl 11:S220-4

223. Parker SB, Dobrian AD, Wade SS, Prewitt RL: AT(1) receptor inhibition does not reduce arterial wall hypertrophy or PDGF-A expression in renal hypertension. *Am.J. Physiol.HeartCirc.Physiol.*2000.Feb.;278. (2.):H613.-22

224. Ma J, Nishimura H, Fogo A, Kon V, Inagami T, Ichikawa I: Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of angiotensin type 2 receptor

- null mutant mice during ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1998;53:937-944
225. Wolf G, Schneider A, Helmchen U, Stahl RA: AT1-receptor antagonists abolish glomerular MCP-1 expression in a model of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Exp.Nephrol.* 1998;6:112-120
226. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S: Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1995;47:1285-1294
227. Satoh M, Kashihara N, Yamasaki Y, Maruyama K, okamoto K, Maeshima Y, Sugiyama H, Sugaya T, Murakami K, Makino H. Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1 a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:317-325
228. Moriyama T, Fujibayashi M, Fujiwara Y, Kaneko T, Xia C, Imai E, Kamada T, Ando A, Ueda N: Angiotensin II stimulates interleukin-6 release from cultured mouse mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1995;6:95-101
229. Ito Y, Goldschmeding R, Bende R, Claessen N, Chand M, Kleij L, Rabelink T, Weening J, Aten J: Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2001.Mar.; 12.(3.):472.-84
230. Blume A, Lebrun CJ, Herdegen T, Bravo R, Linz W, Mollenhoff E, Unger T: Increased brain transcription factor expression by angiotensin in genetic hypertension. *Hypertension* 1997;29:592-598
231. Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL: A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 1995;14:927-939
232. Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM: Role of ceramide in cellular senescence. *J.Biol.Chem.* 1995;270:30701-30708
233. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Horiuchi M, Ogihara T: Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells.

Hypertension 2001;Feb.;37.(2.Part.2.):581.-6

234. Chaturvedi MM, Kumar A, Darnay BG, Chainy GB, Agarwal S, Aggarwal BB: Sanguinarine (pseudocheleerythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation. *J.Biol.Chem.* 1997;272:30129-30134

235. Puri PL, Avantaggiati ML, Burgio VL, Chirillo P, Colleparado D, Natoli G, Balsano C, Leviero M: Reactive oxygen intermediates mediate angiotensin II-induced c-Jun.c-Fos heterodimer DNA binding activity and proliferative hypertrophic responses in myogenic cells. *J.Biol.Chem.* 1995;270:22129-22134

236. Garcia J, Lemercier B, Roman-Roman S, Rawadi G: A Mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J.Biol.Chem.* 1998;273:34391-34398

237. Sen CK, Packer L: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996;10:709-720

238. Silvennoinen O: Immunodeficiencies and haematological disorders--direct connections to cellular signalling pathways. *Ann.Med.*1997;29:519-529

239. Song K, Shiota N, Takai S, Takashima H, Iwasaki H, Kim S, Miyazaki M: Induction of angiotensin converting enzyme and angiotensin II receptors in the atherosclerotic aorta of high-cholesterol fed Cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis* 1998;138:171-182

240. Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Huxford T, Ghosh G: Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J.Biol.Chem.*2000.Sep.22.;275.(38.):29840.-6

241. Lehtonen JY, Horiuchi M, Daviet L, Akishita M, Dzau VJ: Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 1999;274:16901-16906

242. Khayyall M, MacGregor J, Brown JJ, Lever AF, Robertson JI: Increase of plasma renin-substrate concentration after infusion of angiotensin in the rat. *Clin.Sci.* 1973;44:87-90

243. Nabeshima A, Ikematsu H. A case of an elderly patient with dementia and gait disturbance associated with influenza. *Kansenshogaku Zasshi*. 1997 Sep;71(9):944-8
244. Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S: Induction of rat liver angiotensinogen mRNA following acute inflammation. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 1985;129:826-832
245. Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P: Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ.Res.* 1994;74:727-739
246. Jacobson SH, Hylander B, Thylen P, Lundahl J: Monocyte-related determinants of inflammation in patients on peritoneal dialysis. *Am J. Nephrol.* 2001;Jan-Feb,21(1):40-6.
247. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, Klar-Mohamad N, Gerritsen AF, Bruijn JA, Daha MR, van Es LA: Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1995;48:1477-1486
248. Hoj PB, Svendsen I, Scheller HV, Moller BL: Identification of a chloroplast-encoded 9-kDa polypeptide as a 2[4Fe-4S] protein carrying centers A and B of photosystem I. *J.Biol.Chem.* 1987;262:12676-12684
249. Tang WW, Qi M, Warren JS: Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GN. *Kidney Int.* 1996;50:665-671
250. Ou ZL, Natori Y: Gene expression of CC chemokines in experimental acute tubulointerstitial nephritis. *J.Lab.Clin.Med.* 1999;133:41-47
251. Yamashiro S, Takeya M, Kuratsu J, Ushio Y, Takahashi K, Yoshimura T: Intradermal injection of monocyte chemoattractant protein-1 induces emigration and differentiation of blood monocytes in rat skin. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1998;115:15-23
252. Obata J, Nakamura T, Takano H, Naito A, Kimura H, Yoshida Y, Shimizu F, Guo DF, Inagami T: Increased gene expression of components of the renin-angiotensin system in glomeruli of genetically hypertensive rats. *J.Hypertens.* 2000.Sep.;

18.(9.):1247.-55

253. Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Schmidt F, Theuer J, Breu V, Mackman N, Luther T, Schneider W, Gulba D, Ganten D, Haller H, Luft FC: Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am.J.Pathol.*2000;Jul.;157.(1.):111.-22

254. Hall J, Thomas KL, Everitt BJ: Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur.J.Neurosci.*2001.Apr.;13.(7.):1453.-8

255. Rothman A, Wolner B, Button D, Taylor P: Immediate-early gene expression in response to hypertrophic and proliferative stimuli in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1994;269:6399-6404

256. Sukhatme VP, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG, Tsai-Morris CH: A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* 1987;1:343-355

257. Weigert C, Sauer U, Brodbeck K, Pfeiffer A, Haring HU, Schleicher ED: AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF-beta1 promoter in mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.*2000.Nov.;11.(11.):2007.-16

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

- ♦ Ang, angiotensina
- ♦ Ao, Angiotensinógeno
- ♦ AP-1, proteína activadora-1
- ♦ APA, aminopeptidasa-A
- ♦ BK, bradiquinina
- ♦ COX-2, ciclooxigenasa-2
- ♦ CREBP, proteína de unión a la secuencia CRE
- ♦ CTGF, factor de crecimiento del tejido conectivo
- ♦ ET-1, endotelina-1
- ♦ EGF, factor de crecimiento endotelial
- ♦ GAPDH, gliceraldehido-3-fosfodeshidrogenasa
- ♦ I κ -B, inhibidor κ -B
- ♦ ICAM-1, molécula de adhesión intracelular-1
- ♦ iECA, inhibidor de la enzima convertora de angiotensina
- ♦ IFN, interferón gamma
- ♦ IGF, factor de crecimiento de insulina
- ♦ IL-1, interleuquina-1
- ♦ JAK, quinasa activadora Jun
- ♦ LDL, lipoproteína de baja densidad
- ♦ LPS, lipopolisacárido
- ♦ LTB, leucotrieno B
- ♦ MAPK, quinasa activadora mitogénica
- ♦ MCP-1, proteína quimioattractante de monocitos-1
- ♦ NEP, endopeptidasa neutral

- ♦ NF- κ B, factor nuclear- κ B
- ♦ NO, óxido nítrico
- ♦ OVA, ovoalbúmina
- ♦ PAF, factor activador de plaquetas
- ♦ PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1
- ♦ PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas
- ♦ PDTC, pirrolidinditiocarbamato
- ♦ PEP, prolin-endopeptidasa
- ♦ PKC, proteína quinasa C
- ♦ PMA, forbol de miristato-acetato
- ♦ PP2A, proteína fosfatasa-2
- ♦ PTHrP, proteína relacionada con la paratohormona
- ♦ PTK, fosfo-tirosina quinasa
- ♦ ROS, radicales libres de oxígeno
- ♦ SOD, superóxido dismutasa
- ♦ SRA, sistema renina-angiotensina
- ♦ SRF, elemento de respuesta al suero
- ♦ STF, suero de ternera fetal
- ♦ TGF- β , factor de crecimiento transformante- β
- ♦ TNF- α , factor de necrosis tisular- α
- ♦ VCAM-1, molécula de adhesión de células vasculares
- ♦ VEGF, factor de crecimiento de células endoteliales vasculares

